

FR99/2691

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 06 DEC. 1999

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Planche', is written over a horizontal line.

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

This Page Blank (uspto)

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : (1) 42.94.52.52 Télécopie : (1) 42.93.59.30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

05 NOV 1998

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 13946 -

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

75

DATE DE DÉPÔT

05 NOV. 1998

BECKER & ASSOCIES  
10 Rue de Milan  
75008 PARIS

**2 DEMANDE** Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande de brevet européen



demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

B0018 FR

01 44 51 18 00

01 44 51 18 00

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

date

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

EXOSOMES MODIFIES ET UTILISATIONS

**3 DEMANDEUR (S)**

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

1) INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE

2) INSTITUT CURIE

Forme juridique

Etablissement public

Fondation reconnue  
d'utilité publique

Nationalité (s) française

Adresse (s) complète (s)

101 rue de Tolbiac  
75654 PARIS CEDEX 13

Pays

FRANCE

2) 26 rue d'Ulm  
75248 PARIS CEDEX 05

FRANCE

**4 INVENTEUR (S)** Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

**5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES**

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

**6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE**

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

**7 DIVISIONS** antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

**8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE**

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

BECKER Philippe - CPI n° 97.0800



DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 Paris Cédex 08  
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

# BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR  
(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9813946

TITRE DE L'INVENTION :

EXOSOMES MODIFIES ET UTILISATIONS.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD S.A.  
3, rue Chauveau-Lagarde  
FR-75008 PARIS


DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- 1) BONNEROT Christian  
6 impasse Marchand - 94130 NOGENT SUR MARNE
- 2) BENAROCH Philippe  
32 bis, avenue René Coty - 75014 PARIS
- 3) AMIGORENA Sebastian  
124 bld Auguste Blanqui - 75013 PARIS
- 4) VINCENT-SCHNEIDER Hélène  
13 allée Berlioz - 94800 VILLEJUIF
- 5) STUMPTNER Pamela  
22 rue Pasteur - 92160 ANTONY
- 6) RAPOSO Graça  
8 rue Saint-Martin - 75004 PARIS

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 8 février 1999

  
DESAIX Anne  
CPI n° 93-3006

La présente invention concerne les domaines de la biologie et de l'immunologie. Elle est relative à des vésicules membranaires comportant des molécules, notamment antigéniques, de structure prédéterminée, et à leurs utilisations. Elle concerne plus particulièrement des vésicules comportant des molécules recombinantes du complexe majeur d'histocompatibilité, et leur utilisation comme immunogène ou comme outil diagnostique ou thérapeutique. L'invention est également relative à des méthodes de production de ces vésicules, des constructions génétiques, cellules et compositions, utilisables pour la mise en oeuvre des méthodes de l'invention.

La spécificité de la reconnaissance antigénique est une caractéristique majeure des cellules du système immunitaire. Les lymphocytes B reconnaissent les antigènes sous forme native. Les lymphocytes T reconnaissent les complexes formés par l'association de peptides provenant de la dégradation d'antigènes avec des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH).

Les peptides, dérivés des antigènes synthétisés par les cellules de l'organisme (antigènes tumoraux ou viraux), s'associent aux molécules de classe I du CMH qui sont reconnues par les lymphocytes T cytotoxiques. Les peptides dérivés d'antigènes exogènes s'associent aux molécules de classe II du CMH qui sont reconnues par les lymphocytes T auxiliaires. L'identification des peptides présentés par les molécules du CMH et reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques (CD8) ou auxiliaires (CD4) a été à l'origine de nouvelles stratégies thérapeutiques et vaccinales. Cette évolution des immunothérapies nécessite le développement de techniques d'évaluation de la réponse immunitaire spécifique d'antigènes.

Les peptides antigéniques s'associent avec les molécules du CMH dans des compartiments intracellulaires. Pour les molécules de classe II, ceux-ci sont composés de vésicules, contenues dans un granule plus large appartenant à la voie endocytaire (Peters et al., Nature 349 (1991) 669). Leur fusion avec la membrane plasmique aboutit d'une part, à l'expression de complexes peptide-CMH à la surface cellulaire et d'autre part, à la sécrétion de ces vésicules appelées exosomes.

Les travaux de Raposo et al. (J. Exp. Med. 183 (1996) 1161) ont montré que les lymphocytes B sont capables de sécréter des vésicules exosomes, portant des molécules de classe II du CMH. En outre, Zitvogel et al. (Nature Medicine 4 (1998) 594) ont mis en évidence la production de vésicules membranaires particulières par les cellules dendritiques (désignées dexosomes),  
5 ayant des propriétés avantageuses. Ainsi, ces vésicules expriment des molécules des classes I et II du CMH, et sont capables, après sensibilisation aux antigènes correspondants, de stimuler in vivo la production de lymphocytes T cytotoxiques et de provoquer la régression totale ou partielle de tumeurs.

10 La présente invention concerne de nouvelles méthodes et compositions utilisables dans les domaines de la biologie et de l'immunologie. Plus particulièrement, la présente invention décrit de nouvelles vésicules membranaires dont la composition a été modifiée de manière déterminée. En particulier, la présente invention décrit une nouvelle méthode permettant la  
15 production, à façon, de vésicules exprimant des molécules du complexe CMH de composition connue, éventuellement complexées à des peptide antigéniques de structure déterminée. La présente invention permet donc de modifier la composition de vésicules membranaires de façon contrôlée, et donc de créer des produits particulièrement avantageux sur le plan thérapeutique, diagnostique ou  
20 même expérimental.

Ainsi, les vésicules décrites jusqu'à présent comportent, dans le meilleur des cas, les molécules du CMH endogènes, c'est-à-dire les molécules du CMH exprimées par la cellule dont elles sont issues. De ce fait, ces molécules sont de structure variée, pas toujours identifiées, et généralement multiples, selon le type  
25 HLA de l'organisme dont elles sont issues. Au contraire, la présente invention permet de produire des vésicules membranaires portant des molécules du CMH de composition définie. En outre, les vésicules de l'invention présentent l'avantage d'être très riches en molécules du CMH ainsi déterminées, et d'offrir un puissant pouvoir immunogène.

30 La présente invention concerne notamment des vésicules membranaires comprenant des molécules de structure prédéterminée, notamment des

molécules du CMH de structure prédéterminée. La présente invention concerne en particulier des vésicules membranaires comprenant des complexes CMH-peptide de structure prédéterminée. La présente invention concerne également une méthode de modification de la composition d'une vésicule membranaire  
5 comprenant l'introduction, dans une cellule productrice d'une telle vésicule, d'un acide nucléique comprenant une région hybride composée d'une région codante fusionnée à une région d'adressage, ou d'un acide nucléique codant pour une protéine ou polypeptide qui, seule ou associée à une ou plusieurs protéines, est naturellement adressée dans ces vésicules membranaires.

10 La présente invention concerne également des vésicules membranaires comprenant des molécules antigéniques définies, ancrées dans la partie membranaire. De telles molécules peuvent être exposées à l'extérieur des vésicules ou, au contraire, renfermées dans la fraction cytosolique. La présente invention concerne encore des vésicules membranaires comprenant des  
15 molécules de structure prédéterminée, exposées à leur surface, permettant leur purification, notamment par des méthodes d'affinité. La présente invention concerne aussi des vésicules membranaires telles définies ci-dessus comprenant en outre un marqueur. Un tel marqueur permet notamment la détection des vésicules dans un échantillon, par exemple leur suivi in vivo.

20 L'invention concerne également un procédé de préparation des vésicules définies ci-dessus, ainsi que l'utilisation de ces vésicules. Ainsi, ces vésicules peuvent être utilisées comme immunogène, pour la préparation d'anticorps. De manière particulièrement avantageuse, ces vésicules sont utilisées pour produire des anticorps restreints au CMH, c'est-à-dire, spécifique d'un complexe peptide-  
25 molécule du CMH.

Un premier objet de l'invention réside plus particulièrement dans une vésicule membranaire, caractérisée en ce qu'elle comporte une molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité.

Le terme vésicule membranaire désigne au sens de l'invention notamment  
30 toute vésicule composée d'une bicouche lipidique renfermant une fraction cytosolique. Ces vésicules sont généralement produites par relargage, à partir de

cellules, et sont de ce fait également désignées dans la présente demande par le terme "exosome". Les vésicules membranaires (ou exosomes) selon l'invention ont généralement un diamètre de 60 à 80 nm environ. En outre, ces vésicules portent, avantageusement, des protéines membranaires qui sont dans la même orientation que dans la membrane plasmique des cellules dont elles sont issues.

La présente invention montre maintenant qu'il est possible de modifier la composition des exosomes, de manière contrôlée et spécifique. Plus particulièrement, la présente invention montre qu'il est possible de produire des vésicules membranaires exprimant des complexes moléculaires recombinants de composition (pré)déterminée. Comme illustré plus loin dans la présente description, de telles vésicules présentent des propriétés particulièrement avantageuses, tant sur le plan thérapeutique que diagnostique et expérimental.

La présente invention découle tout d'abord de la sélection de populations cellulaires particulières pour la production des vésicules membranaires. La présente invention résulte également de la mise en évidence qu'il est possible d'introduire dans ces cellules, par voie génétique, des molécules recombinantes, et que ces molécules sont ensuite exprimées de manière fonctionnelle et dense dans les exosomes.

L'un des premiers éléments de l'invention réside donc dans la définition et l'identification de la population cellulaire utilisée pour la production des vésicules membranaires. Avantageusement, la cellule utilisée est une cellule comportant des vésicules internes de sécrétion, cultivable, modifiable génétiquement, et, préférentiellement, dont les vésicules internes peuvent être sécrétées sous l'effet d'une stimulation externe. Il s'agit essentiellement de cellules de mammifère, en particulier de cellules animales, mais également de cellules d'origine humaine. Par ailleurs, il peut s'agir de cultures primaires ou de lignées immortalisées.

De manière particulièrement avantageuse, les cellules de départ sont essentiellement dépourvues de molécules du CMH, c'est-à-dire n'expriment pas ou peu de molécules du CMH endogène. Cette caractéristique peut s'avérer très importante dans certaines applications, comme il sera illustré plus loin.



Différents types de cellules productrices d'exosomes ont été décrits dans la littérature, tels que par exemple les cellules dendritiques ou les lymphocytes B. Néanmoins, ces cellules sont généralement difficiles à transfecter et riches en molécules du CMH endogènes. De ce fait, bien qu'elles puissent être utilisées  
5 pour la mise en oeuvre de l'invention, les vésicules de la présente invention sont plus préférentiellement susceptibles d'être obtenues à partir de cellules de mastocytes ou dérivées de mastocytes.

Dans un mode de réalisation particulier, les vésicules membranaires selon l'invention sont préférentiellement préparées à partir de cellules de mastocytes  
10 ou dérivées de mastocytes.

Les mastocytes regroupent un ensemble de types cellulaires dérivés de précurseurs médullaires, résidant, après différenciation, dans des épithélia comme la peau, le poumon, l'intestin ou la rate (Smith et Weis, Immunology Today 17 (1996) 60). Ces cellules se caractérisent essentiellement par le fait que  
15 leur cytoplasme est majoritairement constitué de granules qui contiennent de l'histamine, ainsi que de l'héparine ou des protéases, et en ce qu'elles expriment à leur surface des récepteurs de haute affinité pour les immunoglobulines E (IgE). En outre, un autre avantage de l'utilisation de mastocytes selon l'invention réside dans la possibilité de déclencher (en particulier de stimuler fortement)  
20 l'exocytose (i.e., la libération) des exosomes par différents traitements. Ainsi, il est possible de réguler la production des vésicules par traitement en présence d'un ionophore calcique ou, de manière plus physiologique, par la stimulation des récepteurs de haute affinité pour les IgE.

Ces cellules présentent des propriétés particulièrement avantageuses pour la mise en oeuvre de la présente invention, à savoir la présence de  
25 vésicules internes de sécrétion, la possibilité de les cultiver et d'induire une exocytose massive. En outre, il a maintenant été montré, comme décrit dans les exemples, que ces cellules peuvent également être modifiées génétiquement de manière stable, ce qui représente une propriété particulièrement avantageuse  
30 pour la mise en oeuvre de la présente invention.

Plus spécifiquement, les vésicules selon l'invention ont un diamètre de 60 à 80 nm environ, et sont produites à partir de cellules de mastocytes ou dérivées de mastocytes.

Dans un mode préféré, les vésicules membranaires de l'invention sont essentiellement dépourvues de molécules du CMH endogènes. L'absence de molécules endogènes du CMH (c'est-à-dire de molécules du CMH de la cellule productrice des vésicules) peut être mise en évidence au moyen d'anticorps spécifiques, par les techniques classiques. Elle peut également être mise en évidence par la sélectivité des anticorps obtenus par immunisation avec les vésicules. Comme indiqué dans les exemples, les vésicules de l'invention sont, dans un mode particulièrement avantageux, capables d'induire, chez l'animal, une production d'anticorps spécifiques des molécules recombinantes définies exprimées par elles, sans détection d'anticorps dirigés contre les cellules non modifiées génétiquement. Le terme "essentiellement" dépourvu désigne le fait que certaines molécules du CMH peuvent être présentes en quantités très faibles, difficilement détectables par les méthodes classiques, et sans interférence notable sur la spécificité antigénique des vésicules de l'invention.

Des vésicules membranaires particulières selon l'invention sont plus spécifiquement caractérisées par les propriétés suivantes:

- elles sont essentiellement dépourvues de molécules du CMH endogènes,
- elles portent une ou des molécules recombinantes de structure définie, par exemple des complexes peptide-CMH recombinants, de composition définie.

De telles vésicules de l'invention sont avantageusement produites à partir de cellules dérivées de mastocytes, qui sont essentiellement dépourvues de molécules du CMH endogènes. A cet égard, il est connu que les mastocytes accumulent dans leur granules de sécrétion des molécules de classe II du CMH. En particulier, les mastocytes sont capables d'accumuler de manière préférentielle les complexes CMH-II-peptide dans des compartiments intracellulaires multivésiculaires particuliers, les granules de sécrétion (Raposo et

al., Mol. Biol. Cell 8 (1997) 2619). Ces cellules, prélevées chez un mammifère, comportent donc des molécules du CMH endogènes. De manière particulièrement avantageuse, on utilise dans le cadre de la présente invention des lignées de cellules dérivées de mastocytes, essentiellement dépourvues de

5 molécules du CMH endogènes. Différentes lignées de cellules mastocytaires ont été décrites dans la littérature. La présente demande montre maintenant que certaines de ces lignées possèdent des niveaux faibles de molécules du CMH, et sont donc particulièrement avantageuses pour la mise en oeuvre de l'invention. A titre illustratif, on peut citer notamment des lignées dérivées des cellules RBL

10 (Rat Basophilic Leukemia), déposées à l'ATCC sous le numéro CRL1378 (Kulczycki et al., J. Exp. Med. 139 (1974) 600), la lignée KU-812 (Butterfield et al., Leukemia Res. 12 (1988) 345), ou encore des cellules d'une lignée de mastocytes immatures humains, telle que la lignée HMC (Nilsson et al., Scand. J. Immunol. 39 (1994) 489). Un exemple particulier de lignée est la lignée RBL -

15 2H3 (Barsumian et al, Eur. J. Immunol. (11 (1981) 317). Il est entendu que toute autre cellule présentant les propriétés énoncées ci-dessus peut être mise en oeuvre.

Dans le cadre de la présente invention, l'expression "composition définie" désigne plus particulièrement le fait que les vésicules de l'invention possèdent

20 par exemple une grande spécificité antigénique et d'haplotype. Ainsi, les vésicules décrites dans l'art antérieur expriment généralement des molécules du CMH d'haplotypes divers et inconnus. Au contraire, les vésicules préférées de l'invention expriment des molécules recombinantes dont l'haplotype est prédéterminé de manière précise. Le terme "recombinant" indique que la

25 molécule résulte de l'expression, dans la cellule productrice des vésicules, d'un acide nucléique recombinant codant pour cette molécule. Les vésicules membranaires selon la présente invention sont donc plus préférentiellement produites à partir de cellules, établies en lignées, qui sont modifiées génétiquement pour exprimer des constituants de structure prédéterminée.

30 Comme indiqué ci-avant, les vésicules de l'invention expriment avantageusement des molécules définies du CMH.

Les molécules du CMH humain se regroupent dans deux classes distinctes, les molécules du CMH de classe I et les molécules du CMH de classe II.

5 Dans un mode particulier de réalisation, les vésicules selon l'invention expriment une ou plusieurs molécules recombinantes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II. A cet égard, les molécules du CMH humain de classe II sont composées de deux chaînes, une chaîne  $\alpha$  et une chaîne  $\beta$ , la chaîne  $\beta$  conférant la spécificité allélique au complexe.

10 Dans une variante spécifique, les vésicules selon l'invention expriment plus particulièrement une chaîne  $\alpha$  recombinante d'une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II. Dans une autre variante spécifique, les vésicules selon l'invention expriment plus particulièrement une chaîne  $\alpha$  et une chaîne  $\beta$  recombinantes d'une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II.

15 Différents types de molécules du CMH II humaines ont été identifiés, caractérisés et séquencés (voir par exemple Immunogenetics 36 (1992) 135). On peut citer à titre préférentiel les molécules de type DR1 à DR13, notamment DR1, DR2, DR3, DR4, DR5, DR6 et DR7. L'ADN codant pour les DR humains, en particulier les DR1 à 13, peut être aisément isolé à partir de cellules, banques  
20 ou plasmides par les techniques classiques de biologie moléculaire. Ces séquences ont notamment été décrites dans Bodmer et al. (Tissue antigens 44 (1994) 1). De préférence, les exosomes selon l'invention expriment donc une molécule du CMH de classe II comprenant une chaîne  $\alpha$  et une chaîne  $\beta$  sélectionnées parmi les haplotypes DR1 à DR13, encore plus préférentiellement  
25 DR1 à DR7.

Dans un exemple spécifique, l'invention concerne toute vésicule membranaire comprenant une chaîne  $\alpha$  et/ou  $\beta$  recombinante d'une molécule du CMH-II d'haplotype DR1.

30 Dans un autre mode de réalisation, les vésicules selon l'invention expriment une ou plusieurs molécules recombinantes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. Les molécules du CMH classe I sont composées

également de deux chaînes, la chaîne  $\alpha$  transmembranaire et polymorphique, et la  $\beta$ 2-microglobuline, qui est constante et soluble. Chez l'homme, trois locus génétiques codent pour la chaîne  $\alpha$ , désignés A, B et C. Dans les molécules de CMH-I classiques, chaque locus A, B et C de la chaîne  $\alpha$  est soumis à une  
 5 variation allélique. Ainsi, on dénote les allèles A1, A2, A3, etc. A10, B1, B7, B37, B54, etc., CW3, CW6, etc. (voir par exemple Bodmer et al. précitée et Immunogenetics 36, 1992, précitée).

Préférentiellement, les exosomes de l'invention expriment une chaîne  $\alpha$  d'une molécule du CMH-I classique, c'est-à-dire transmembranaire et  
 10 polymorphique. Encore plus préférentiellement, il s'agit d'une chaîne  $\alpha$  d'une molécule du CMH-I d'allèle A1, A2 ou A3.

Dans un mode particulier de mise en oeuvre, les exosomes selon l'invention expriment une chaîne  $\alpha$  d'une molécule du CMH-I non-classique, c'est-à-dire non-polymorphique. En effet, par opposition aux CMH-I dits  
 15 "classiques", soumis à un polymorphisme important, il existe chez l'homme des molécules du CMH-I "non-classiques", qui sont essentiellement non polymorphiques. De telles molécules ont par exemple été décrites dans Bendelac et al. (Ann. Rev. Immunol. (1997) 535). Un exemple préféré de CMH-I non-classique selon l'invention est représenté par la molécule Cd1.

20 Il est entendu que tout autre molécule du CMH-I humain peut être exprimée dans le cadre de la présente invention.

Dans un exemple spécifique, l'invention concerne donc toute vésicule membranaire comprenant une protéine recombinante d'une molécule du CMH-I.

Dans une variante particulière, les vésicules de l'invention comportent  
 25 plusieurs molécules du CMH de classe I et/ou II. Ainsi, une vésicule avantageuse comporte par exemple 2 molécules du CMH-II d'haplotypes différents, ou plus. Toute autre combinaison de molécules du CMH est bien entendu possible, telle que par exemple des CMH-I et CMH-II.

Les vésicules de l'invention exprimant un ou plusieurs complexes du CMH  
 30 définis sont particulièrement avantageuses puisqu'elles permettent de présenter un peptide antigénique donné, dans un contexte MHC défini. A cet égard, dans

un mode plus préféré de l'invention, les vésicules membranaires comportent un complexe entre un peptide défini et la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité.

Les vésicules de l'invention peuvent par ailleurs comporter une ou  
5 plusieurs autres molécules d'intérêt, hétérologues, en plus ou à la place des molécules du CMH mentionnées ci-dessus. A cet égard, dans une variante particulière, l'invention concerne des vésicules membranaires produites à partir de cellules de mastocytes ou dérivées de mastocytes, caractérisées en ce qu'elles comportent une ou des molécules hétérologues d'intérêt. Le terme  
10 cellule "dérivée" de mastocytes désigne des lignées transformées et/ou immortalisées et/ou obtenues à partir de cellules de mastocytes ou de basophiles et présentant des propriétés de cellules de mastocytes (accumulation de vésicules internes de sécrétion). Le terme "hétérologue" indique que la molécule d'intérêt n'est pas présente, sous cette forme, dans les exosomes de  
15 l'invention à l'état naturel.

Les molécules d'intérêt portées par ou contenues dans les exosomes de l'invention peuvent être toute protéine, polypeptide, peptide, acide nucléique, lipide, ainsi que toute substance d'intérêt (de nature chimique, biologique ou synthétique). Ces molécules peuvent être de nature recombinante, et être  
20 introduites dans la cellule productrice ou directement dans/sur les exosomes. Des types plus particulièrement préférés de molécules d'intérêt sont notamment des molécules du CMH, des antigènes (entiers ou sous forme de peptides), des ligands de récepteurs, des récepteurs (spécifiques) de ligands, des acides nucléiques, des produits pharmacologiques, des marqueurs ou encore des  
25 peptides ou protéines permettant une purification des vésicules.

Comme antigène, on peut citer plus particulièrement toute protéine, notamment cytoplasmique, d'origine virale ou tumorale. A titre d'exemples préférés de protéines d'origine virale, on peut citer notamment toute protéine cytoplasmique ou membranaire exprimée par les virus EBV, CMV, VIH, rougeole,  
30 hépatite, etc. Il s'agit plus préférentiellement des protéines cytoplasmiques, c'est-à-dire essentiellement invisibles au système immunitaire dans le processus

d'infection classique, et donc faiblement immunogènes dans les conditions naturelles ou également de protéines ou fragments de protéines membranaires. A titre d'exemples préférés de protéines d'origine tumorale, on peut citer notamment les protéines p53 (sauvage ou toute forme mutée présente dans une tumeur), MAGE (notamment MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3, MAGE 4, MAGE 5 et MAGE 6), MART (notamment MART 1), la Gp100, les protéines ras (p21 sauvage ou mutées), etc. Il est entendu que toute autre protéine d'intérêt peut être exprimée dans ou à la surface des exosomes de l'invention, en suivant l'enseignement de la présente demande.

A cet égard, les molécules antigéniques recombinantes peuvent être présentes soit à la surface des vésicules (exposées), soit à l'intérieur des vésicules. En effet, de manière particulièrement surprenante, les inventeurs ont montré que des vésicules de l'invention contenant, dans leur cytosol, un antigène recombinant (notamment p53) étaient capables d'induire, chez l'animal, une production très élevée d'anticorps dirigés contre cet antigène.

Parmi les récepteurs de ligands, on peut citer, de manière générale, tout récepteur de ligand naturel ou issu de manipulations génétiques. En particulier, il peut s'agir de tout récepteur d'hormone, facteur de croissance, lymphokine, facteur trophique, antigène, etc. On peut citer plus particulièrement les récepteurs des interleukines IL1 à IL15, le récepteur de l'hormone de croissance, ou le récepteur de facteurs de stimulation de colonies de granulocytes et/ou macrophages (G-CSF, GM-CSF, CSF, etc). Un exemple particulier de récepteur de ligand est composé d'un anticorps simple-chaîne (ScFv), qui permet l'interaction avec un ligand spécifique. Un autre exemple particulièrement avantageux au sens de l'invention est représenté par le récepteur à l'antigène des lymphocytes T (TcR). Des exosomes de l'invention exprimant à leur surface un ou plusieurs TcR définis constituent des outils d'analyse et de diagnostic particulièrement avantageux, comme il sera détaillé plus loin.

Comme produit pharmacologique, on peut citer toute substance active, de nature chimique, telle que par exemple des produits pharmaceutiques préparés par les techniques de chimie conventionnelles. On peut également citer toute

protéine, polypeptide ou peptide ayant une activité biologique, tel que par exemple une toxine, une hormone, une cytokine, un facteur de croissance, une enzyme, un suppresseur de tumeur, etc.

5 L'acide nucléique peut être tout ADN ou ARN codant pour une protéine, polypeptide ou peptide pharmacologique tel que mentionné ci-dessus, ainsi que tout autre acide nucléique présentant une propriété particulière (antisens, antigène, promoteur, répresseur, site de liaison d'un facteur transcriptionnel, etc.). Il peut s'agir d'un oligonucléotide, d'une phase codante, d'un chromosome artificiel, etc.

10 Les vésicules de l'invention portant un récepteur de ligand peuvent être utilisées pour la détection de toute interaction de type récepteur-ligand, en particulier de faible affinité, dans tout échantillon biologique, comme il sera expliqué plus en détails dans la suite du texte. D'autre part, de telles vésicules peuvent également être utilisées pour véhiculer les substances d'intérêt  
15 (protéine, peptide, nucléique acide, substance chimique, etc.) vers des cellules. Ainsi, les exosomes de l'invention peuvent être utilisés, de manière générale, pour le transport et le transfert de toute molécule dans des cellules, in vitro, ex vivo ou in vivo. L'invention concerne donc toute vésicule telle que décrite ci-avant comprenant une molécule hétérologue d'intérêt, utilisable comme vecteur de  
20 transfert de ladite molécule dans une cellule.

Dans un mode plus préféré, les exosomes de l'invention sont utilisés pour le transfert orienté de substances d'intérêt vers des populations cellulaires sélectionnées. Ainsi, il est possible de préparer des vésicules de l'invention comportant une substance d'intérêt (une toxine, une hormone, une cytokine, un  
25 acide nucléique recombinant, etc.) et exprimant à sa surface un récepteur de ligand ou un ligand de récepteur, et de mettre en contact lesdites vésicules avec des cellules exprimant le ligand ou le récepteur correspondant. Cette approche permet donc un transfert ciblé et efficace.

A cet égard, un objet particulier de l'invention réside dans une vésicule  
30 telle que définie ci-avant, caractérisée en ce qu'elle exprime un récepteur de ligand et en ce qu'elle comporte une molécule hétérologue d'intérêt.



Les vésicules de l'invention peuvent en outre comporter un peptide ou une protéine recombinant permettant une purification des vésicules. Ainsi, l'invention décrit en effet la possibilité de modifier génétiquement la composition des exosomes, et donc de leur faire exprimer une molécule "étiquette" particulière, permettant sa purification. En particulier, il est possible d'obtenir un exosome exposant un peptide de structure particulière, qui peut être aisément détecté et capté par une molécule réceptrice. Dans un exemple particulier, un exosome est produit comportant, dans sa structure, une molécule peptidique comprenant le motif His6 (i.e., 6 résidus histidine consécutifs). La présence d'un tel résidu à la surface des exosomes permet leur purification aisée sur support fonctionnalisé avec du nickel. D'autres peptides recombinants de ce type peuvent être utilisés, comme par exemple le tag c-myc, VSV ou HA.

Enfin, dans une variante particulière, les vésicule selon l'invention comportent en outre un marqueur. Le marqueur peut être de nature différente (enzymatique, fluorescent, radioactif, etc.) et présent dans la vésicule ou à sa surface. Un marquage préféré est non-radioactif, comme par exemple un marquage fluorescent. Plus préférentiellement, le marquage utilisé est un fluorochrome ou une enzyme à substrat chromogénique. Le marquage peut être réalisé directement sur la cellule productrice, ou bien sur les exosomes produits.

L'invention concerne également toute composition comprenant une ou plusieurs vésicules membranaires telles que définies ci-dessus. Les compositions de l'invention peuvent en outre comprendre une pluralité de vésicules membranaires telles que définies ci-dessus, portant des molécules recombinantes différentes. En particulier, une composition selon l'invention peut comprendre des vésicules membranaires telles que définies ci-dessus, portant des molécules recombinantes du CMH d'haplotypes différents en association avec un même peptide antigénique. Il peut s'agir également de compositions comprenant des vésicules membranaires telles que définies ci-dessus, portant des molécules recombinantes du CMH d'un même haplotype, associées à différents peptides antigéniques, par exemple. D'autres combinaisons de vésicules selon l'invention sont bien entendu possibles.

Les compositions de l'invention comprennent généralement un véhicule tel qu'une solution tampon, saline, physiologique, etc., permettant de préserver la structure des vésicules. Elles peuvent en outre comprendre tout agent stabilisant, tensio-actif, etc., de préférence compatible avec un usage biologique (in vitro ou in vivo). Ces compositions peuvent être conditionnées dans tout dispositif approprié, tel que tube, flacon, ampoule, flasque, poche, etc, et stockées à 4°C ou à -20°C, par exemple. Des compositions typiques selon l'invention comprennent de 5 à 500µg d'exosomes, par exemple de 5 à 200 µg.

Les vésicules de l'invention sont obtenues à partir de cellules génétiquement modifiées. Comme indiqué plus haut, la présente invention résulte en effet de la mise en évidence qu'il est possible d'introduire dans certaines cellules, par voie génétique, des molécules recombinantes, et que ces molécules sont ensuite exprimées de manière fonctionnelle et dense dans les exosomes.

Pour la production des vésicules de l'invention portant des molécules recombinantes de composition déterminée, une première étape consiste donc à introduire, dans une cellule productrice de vésicules, telle que définie ci-dessus, les constructions génétiques permettant l'expression de la (ou des) molécule(s) recombinantes sélectionnée(s).

Les constructions génétiques utilisées pour la production des cellules peuvent comprendre, de manière générale, une région codante placée sous le contrôle d'un promoteur fonctionnel dans la cellule utilisée (cassette d'expression).

Généralement, le promoteur utilisé est donc un promoteur fonctionnel dans les cellules mammifères. Il peut s'agir d'un promoteur viral, cellulaire ou bactérien, par exemple. Il peut s'agir d'un promoteur constitutif ou régulé, de préférence permettant une expression à des niveaux élevés de protéine dans la cellule. Parmi les promoteurs utilisables, on peut citer à titre d'exemple le promoteur précoce immédiat du cytomégalo virus (CMV), le promoteur du SV40, le promoteur du gène de la thymidine kinase, notamment HSV-1 TK, le promoteur du LTR d'un rétrovirus, notamment LTR-RSV, ou encore un

promoteur endogène fort des cellules de mastocytes. Un mode de réalisation particulièrement préféré comprend l'utilisation du promoteur SR $\alpha$ , tel que décrit plus en détails dans les exemples.

La région codante utilisée est généralement composée d'un ADN, complémentaire, génomique ou synthétique (par exemple modifié pour comporter certains introns ou pour avoir un usage de codons préférentiel). Plus généralement, il s'agit d'un ADNc. Cet acide nucléique peut être obtenu par toutes les techniques connues de la biologie moléculaire, et notamment par criblage de banque, amplification, synthèse, coupures et ligatures enzymatiques, etc.

Selon le type de région codante utilisée, certaines modifications peuvent par ailleurs être apportées à la construction. Ainsi, il peut être particulièrement avantageux dans certains cas d'introduire dans la région codante une séquence de signalisation, permettant d'adresser le produit d'expression dans un compartiment particulier de la cellule, en particulier vers un compartiment membranaire (interne, plasmique, etc.). Ce signal d'adressage peut être positionné en amont (5'), en aval (3') ou à l'intérieur de la région codante. Préférentiellement, le signal d'adressage est positionné en 3' de la région codante, plus particulièrement dans sa région cytoplasmique, et en phase de lecture avec la région codante. L'emploi d'un signal d'adressage peut être particulièrement utile pour favoriser l'accumulation du produit d'expression dans ou à la surface d'un compartiment intracellulaire donné, notamment dans ou à la surface des vésicules de sécrétion. Ce mode de mise en oeuvre est particulièrement adapté à l'expression d'une molécule telle qu'un peptide étiquette, un antigène, une molécule du CMH-I ou encore un ligand de récepteur. En revanche, de manière particulièrement avantageuse, la présente demande montre que des molécules du CMH-II humaines peuvent être exprimées directement, sans ajout de signal particulier, dans des vésicules sécrétrices de cellules de mastocytes, même xénogéniques.

Pour la mise en oeuvre de la présente invention, il est possible en particulier d'utiliser comme signal d'adressage un fragment d'acide nucléique

ayant la séquence d'une partie des gènes suivants : Lamp1, CD63, LIMP2, Cd1c, FcγR. Ces gènes comportent en effet des régions codant pour des signaux d'adressage de la protéine vers les compartiments de l'endosome des cellules (Sandoval et Bakke, Trends in Cell Biol. 4 (1994) 292). Un signal d'adressage utilisable dans la présente invention répond par exemple à la formule G-Y-X-X-I, dans laquelle X représente tout résidu d'acide aminé. Un signal d'adressage particulièrement adapté à la présente invention est composé du peptide signal de la protéine LAMP1 de séquence SHAGYQTI. Un autre type de signal permettant l'adressage vers les compartiments membranaires, comprend tout ou une partie d'une région transmembranaire de protéine.

Dans les constructions utilisées, la région codante est liée de manière fonctionnelle au promoteur, de manière à permettre son expression dans les cellules.

Par ailleurs, les constructions de l'invention peuvent avantageusement comprendre une région, placée en 3' de la région codante, qui spécifie un signal de fin de transcription (région polyA par exemple).

Les cassettes d'expression selon l'invention font avantageusement partie d'un vecteur, de type plasmidique, viral, épisomal, chromosome artificiel, etc. A cet égard, un tel vecteur comprend avantageusement un système permettant la sélection des cellules le contenant. En particulier, les vecteurs comprennent avantageusement un gène codant pour un produit conférant une résistance à un agent, par exemple à un antibiotique (ampicilline, hygromycine, généticine, néomycine, zéocine, etc.). Dans un mode particulier de mise en oeuvre, chaque vecteur comporte une seule cassette d'expression telle que décrite ci-avant. Dans ce mode de réalisation, les cellules sont donc modifiées par introduction de plusieurs vecteurs, lorsque plusieurs molécules sont à exprimer dans les vésicules (par exemple une chaîne  $\alpha$  et une chaîne  $\beta$  de CMH-II). Dans ce mode de réalisation chaque type de vecteur utilisé comprend avantageusement un système de sélection différent, permettant de sélectionner aisément les multiples transfectants.

Dans un autre mode de réalisation, un vecteur peut comprendre plusieurs cassettes d'expression telles que définies ci-avant, par exemple l'une codant une chaîne  $\alpha$  et l'autre, une chaîne  $\beta$  de CMH-II.

Les vecteurs utilisés sont préférentiellement de type plasmidique, et  
5 comportent par exemple une origine de réplication bactérienne permettant leur manipulation et leur production aisées in vitro. De tels vecteurs peuvent notamment être construits à partir de plasmides de type pBR322, pUC, pBS, pSR, etc.

Pour la production d'exosomes selon l'invention, des cellules modifiées  
10 génétiquement sont donc mises en oeuvre, exprimant les molécules sélectionnées. Ces cellules modifiées génétiquement sont préparées par introduction, dans des cellules choisies comme défini ci-dessus, des constructions génétiques définies ci-avant.

L'introduction des constructions génétiques peut être réalisée de  
15 différentes façons, essentiellement selon le type de cellule utilisé. Ainsi, le transfert des acides nucléiques peut être réalisé par toute technique connue telle que électroporation, précipitation au phosphate de calcium, agent chimique (peptide cationique, polymères, lipides, etc.), balistique, etc. Dans le cas de vecteurs viraux, le transfert est généralement obtenu par simple infection des  
20 cellules. Les quantités de vecteur utilisées peuvent par ailleurs être adaptées par l'homme du métier en fonction du type de transfert et des cellules utilisées. A cet égard, une méthode particulièrement efficace pour l'introduction des acides nucléiques dans les mastocytes comprend l'électroporation des vecteurs.

D'autre part, lorsque plusieurs constructions (vecteurs) doivent être  
25 introduites dans les cellules, celles-ci peuvent être transférées simultanément ou de manière séquentielle.

Après transfert, les cellules ayant effectivement incorporé les acides nucléiques sont sélectionnées et clonées sur la base de leur résistance à un composé (e.g., antibiotique) grâce au gène de résistance présent dans l'ADN  
30 ayant été transféré. Ces cellules peuvent être utilisées extemporanément pour la production d'exosomes de l'invention, ou bien être stockées en vue d'une

utilisation ultérieure. A cet égard, les cellules peuvent être conservées à 4°C dans un milieu de conditionnement usuel pendant une période suffisante pour permettre différents lots de production d'exosomes. Les cellules peuvent également être conservées sous forme congelée (par exemple dans l'azote), en vue d'utilisations ultérieures. A cet égard, il est ainsi possible selon la présente invention de constituer des banques de cellules productrices d'exosomes ayant des propriétés particulières. En particulier, il est possible selon l'invention de constituer des banques de cellules exprimant les principaux types HLA des molécules de classe II du CMH. De ce fait, il est alors possible, selon les applications envisagées et selon le type HLA du sujet, de choisir dans la banque les cellules productrices des molécules du CMH correspondant, sans devoir reconstruire ces cellules au cas par cas.

A cet égard, un objet particulier de l'invention réside dans une cellule productrice d'exosomes telle que définie ci-avant, en particulier une cellule de mastocyte, caractérisée en ce qu'elle comporte un acide nucléique recombinant codant pour une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité. L'invention concerne aussi toute cellule productrice d'exosomes telle que définie ci-avant, en particulier une cellule de mastocyte, caractérisée en ce qu'elle comporte un acide nucléique recombinant codant pour une chaîne invariante Ii, notamment modifiée pour comprendre un peptide antigénique à la place de la région CLIP, ou pour un peptide permettant la purification de l'exosome.

Plus particulièrement, il s'agit d'une cellule mammifère, notamment d'origine animale, en particulier de rongeur. Il peut également s'agir d'une cellule d'origine humaine. Dans un mode plus particulier, il s'agit d'une lignée cellulaire dérivée d'un mastocyte, telle que notamment une lignée mastocytaire d'une leucémie à basophile. A titre d'exemple particulier, on peut citer les cellules de la lignée RBL, notamment RBL-2H3, les cellules de la lignée KU-812 ou HMC-I.

Préférentiellement, l'acide nucléique recombinant code pour une chaîne  $\alpha$  et/ou une chaîne  $\beta$  d'une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II et/ou pour une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. Dans un autre mode de réalisation, la cellule comprend plusieurs acides

nucléiques codant respectivement pour une chaîne  $\alpha$  et une chaîne  $\beta$  d'une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II.

La présente invention permet de produire, de manière simple et reproductible, des quantités importantes d'exosomes de composition connue.  
5 Pour la production des exosomes, les cellules modifiées génétiquement décrites ci-dessus sont cultivées dans un milieu approprié, et les exosomes sont récupérés.

Un objet particulier de l'invention réside ainsi dans un procédé de production d'un exosome comportant une molécule recombinante définie,  
10 comprenant les étapes suivantes:

a) la culture d'une cellule de mastocyte ou dérivée de mastocyte comportant un acide nucléique recombinant codant pour ladite molécule recombinante définie,

c) la récupération des exosomes produits par lesdites cellules, ces  
15 exosomes comprenant ladite molécule recombinante définie.

Avantageusement, le procédé selon l'invention comprend en outre une étape intermédiaire b) au cours de laquelle les cellules sont stimulées pour induire et/ou augmenter la sécrétion des exosomes.

D'autre part, le procédé de l'invention permet la production de vésicules  
20 dans lesquelles la molécule recombinante définie est exposée à l'extérieur de l'exosome, ou est incluse, en partie ou en totalité, dans la fraction cytosolique de l'exosome.

Comme indiqué ci-avant, dans le procédé de l'invention, la molécule recombinante peut être, par exemple, une molécule du complexe majeur  
25 d'histocompatibilité, une molécule antigénique, un ligand de récepteur, un récepteur de ligand ou un peptide de purification, ou tout autre polypeptide d'intérêt. En outre, comme expliqué ci-avant, dans certains modes de réalisation, l'acide nucléique utilisé dans le procédé comprend en outre une région codant pour un signal d'adressage vers les compartiments membranaires, notamment  
30 les vésicules internes de sécrétion, du mastocyte.

Un autre objet particulier de l'invention réside dans un procédé de production d'une vésicule membranaire, comprenant

- la culture d'une cellule productrice d'exosomes, comprenant un acide nucléique recombinant codant pour une molécule recombinante du CMH, en particulier de classe I ou II, et
- la récupération des exosomes produits, le cas échéant après stimulation de l'exocytose.

A cet égard, l'invention concerne également un procédé de préparation d'un exosome comportant un complexe peptide-CMH de composition définie, caractérisé en ce qu'il comprend:

- la culture d'une cellule productrice d'exosomes comportant un ou plusieurs acides nucléiques recombinants codant pour une molécule recombinante définie du CMH,
- la stimulation des cellules pour induire une libération des exosomes,
- la récupération des exosomes produits par lesdites cellules, ces exosomes exprimant à leur surface ladite molécule recombinante définie du CMH, et,
- la mise en contact des exosomes avec le ou les peptides.

Pour la mise en oeuvre de l'invention, le ou les peptides utilisés peuvent être des peptides de synthèse, des mélanges de peptides, des extraits cellulaires, par exemple un mélange de peptides extrait de cellules tumorales. Le ou les peptides peuvent être sous forme isolée, ou purifiée ou, comme indiqué ci-dessus, de mélange. Par ailleurs, après mise en contact des exosomes avec les peptides, les exosomes peuvent être isolés ou purifiés selon les méthodes conventionnelles.

Dans une autre variante, l'invention concerne un procédé de préparation d'un exosome comportant un complexe peptide-CMH de composition définie, caractérisé en ce qu'il comprend:

- la culture d'une cellule productrice d'exosomes comportant un ou plusieurs acides nucléiques recombinants codant pour une molécule



recombinante définie du CMH et un acide nucléique comprenant une région codant pour un peptide recombinant défini,

- la stimulation des cellules pour induire une libération des exosomes,

5                                   - la récupération des exosomes produits par lesdites cellules, ces exosomes exprimant à leur surface ladite molécule recombinante définie du CMH associée audit peptide recombinant.

Plus particulièrement, dans ce procédé, l'acide nucléique comprenant une région codant pour le peptide recombinant code pour un dérivé de la chaîne invariante Ii, dans laquelle la région CLIP a été déletée et substituée par ledit peptide. Ce mode de réalisation assure une grande spécificité dans la formation du complexe peptide-CMH.

Dans une autre variante, l'acide nucléique comprend une région codant pour le peptide et une région d'adressage vers les compartiments intracellulaires. En outre, l'acide nucléique peut comprendre plusieurs régions codant pour un même ou pour des peptides antigéniques différents.

Préférentiellement, les cellules productrices utilisées dans le procédé sont des cellules de mastocyte ou dérivées de mastocyte. Dans ce mode de réalisation, la stimulation des cellules pour induire une libération des exosomes est préférentiellement réalisée au moyen d'un ou plusieurs ionophores calciques, ou par des IgE.

Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, les cellules productrices utilisées dans le procédé sont essentiellement dépourvues de molécules du CMH endogène.

25                                   Un autre objet de l'invention concerne un procédé de modification de la composition d'un exosome, comprenant

- l'introduction dans une cellule productrice d'exosomes d'un acide nucléique codant pour une molécule définie, liée à un signal d'adressage dans les compartiments membranaires, et

30                                   - la production d'exosomes à partir de ladite cellule.

Ce procédé permet avantageusement de produire des exosomes exprimant des molécules recombinantes définies et variées.

Les exosomes de l'invention peuvent être utilisés dans de nombreuses applications, telles que par exemple comme outils d'analyse, de diagnostique, thérapeutique ou expérimental. Ainsi, ils peuvent être utilisés pour l'analyse de la  
5 réponse T antigène spécifique ; pour l'étude des interactions récepteur/ligand de faible affinité où une multimérisation des différents partenaires est nécessaire afin d'augmenter l'avidité de ces complexes moléculaires, dépassant ainsi le champs des applications immunologiques ; sur le plan diagnostique ou  
10 thérapeutique, ainsi que pour la production d'anticorps particuliers, notamment d'anticorps restreints au MHC. Ces différentes applications et d'autres sont illustrées ci-après.

#### a) Utilisation pour la production d'anticorps

15 L'une des premières applications des exosomes de l'invention réside dans la production d'anticorps. En effet, en raison de la composition définie des exosomes de l'invention, il est possible de produire des anticorps de spécificité déterminée. En outre, comme le montrent les exemples, les exosomes de l'invention ont des propriétés immunogènes très fortes, notamment en raison de  
20 la densité élevée des complexes CMH-peptide à leur surface, de leur fonctionnalité, et de leur présentation efficace au système immunitaire.

Les anticorps ainsi produits peuvent être des polyclonaux ou des monoclonaux. Ils peuvent être préparés par les techniques classiques de l'immunologie, comprenant l'immunisation d'animaux, et le prélèvement des  
25 sérums (anticorps polyclonaux) et/ou la fusion des lymphocytes spléniques avec des cellules de myélomes non productrices d'immunoglobulines (pour générer des hybridomes producteurs de monoclonaux).

Un autre objet de l'invention concerne donc des anticorps ou fragments d'anticorps produits par immunisation avec des exosomes tels que décrits ci-  
30 avant. Les fragments d'anticorps peuvent être par exemple des Fab, (Fab')<sub>2</sub>, ScFv, etc., et, plus généralement, tout fragment conservant la spécificité de

l'anticorps. En particulier, l'invention concerne un procédé de préparation d'anticorps, comprenant l'immunisation d'un animal avec un exosome tel que décrit ci-avant, portant un complexe peptide-CMH défini et la récupération des anticorps et/ou des cellules produisant des anticorps ou impliquées dans la  
5 réponse immunitaire. Avantageusement, le procédé de l'invention permet la production d'anticorps monoclonaux, notamment restreints au CMH, c'est-à-dire spécifiques de l'association CMH-peptide. De préférence, dans le procédé de l'invention, on utilise des exosomes essentiellement dépourvus de molécules CMH endogènes, qui expriment des complexes recombinants CMH-peptide, et  
10 qui sont produits à partir d'une cellule autologue vis-à-vis de l'animal chez lequel l'immunisation est réalisée. Ainsi, comme montré dans les exemples, cette méthode permet d'obtenir, sans besoin d'adjuvant, des anticorps puissants dirigés contre le peptide, notamment des anticorps restreints au CMH, c'est-à-dire spécifiques du peptide dans sa conformation associée à la molécule définie  
15 du CMH. De tels anticorps sont particulièrement avantageux sur le plan expérimental, diagnostique et thérapeutique. En outre, les anticorps selon l'invention peuvent être marqués par toute technique connue (enzymatique, fluorescente, radioactive, etc), selon les méthodes connues de l'homme du métier.

20

#### b) Applications diagnostiques

Les exosomes et anticorps de l'invention possèdent des propriétés avantageuses pour une utilisation diagnostique.

Ainsi, les anticorps ou fragments d'anticorps obtenus selon l'invention  
25 peuvent être utilisés dans toute application diagnostique, pour la détection, dans un échantillon biologique, de la présence d'antigènes spécifiques correspondants, grâce à l'emploi de différentes techniques classiques, telles que la cytométrie de flux, l'immunohistochimie ou l'immunofluorescence, par exemple. Dans le cas particulier des anticorps restreints au MHC, ils permettent  
30 avantagement la détection des complexes CMH-peptides correspondants, et donc le diagnostique de pathologies correspondantes. Ces anticorps peuvent

notamment être appliqués au diagnostic de pathologies impliquant un défaut de réponse ou une réponse inappropriée du système immunitaire afin de déterminer l'expression d'un antigène, préalablement défini, sous une forme reconnaissable par des lymphocytes T. Par exemple et de manière non exhaustive, on peut

5 envisager le diagnostic:

- de pathologies tumorales où la détection sur les prélèvements tumoraux de différents peptides issus de protéines comme p53, Her2, MAGE, BAGE, Mart, GP100 associées aux molécules de classe I du CMH peut permettre le phénotypage de la tumeur et faciliter le choix d'une thérapeutique ;
- 10 - de maladies virales à un stade préinfectieux ou latent, où le virion ne peut être détecté (hépatite, les infection par le VIH, le CMV et d'autres virus) ;
- de maladies autoimmunes comme la Sclérose en plaque, le Diabète autoimmun, la Thyroïdite autoimmune, la Polyarthrite rhumatoïde, le Lupus érythémateux disséminé, où la détection de molécules du CMH
- 15 présentant des peptides dérivés d'auto-antigènes peut constituer le signe avant coureur d'une poussée évolutive de la maladie.

Les exosomes selon l'invention sont également utilisables pour la détection de partenaires spécifiques d'une molécule protéique dans un échantillon biologique. Ainsi, les exosomes de l'invention portant des complexes

20 CMH-peptides sont utilisables pour détecter des lymphocytes T spécifiques de ces complexes dans des échantillons biologiques, par exemple dans différentes situations pathologiques, notamment dans les pathologies décrites ci-dessus. A cet égard, les exosomes peuvent être marqués par tout système de marquage connu de l'homme du métier (enzymatique, fluorescent, radioactif, etc.) pour

25 permettre leur détection dans des échantillons biologiques.

Dans un mode particulier, l'invention réside donc dans l'utilisation d'exosomes marqués, notamment fluorescents, tels que décrits ci-avant, pour la détection de lymphocytes T spécifiques de complexes peptide antigénique -CMH dans un échantillon biologique. L'échantillon biologique peut être tout échantillon

30 de sang, sérum, tissu, tumeur, biopsie, peau, urine, etc. En outre, l'échantillon biologique peut être prétraité par exemple pour dissocier les cellules, amplifier

les cellules en culture, préparer des fractions membranaires, etc. Avantageusement, l'échantillon biologique provient d'un organisme humain. A cet effet, l'invention concerne également une méthode pour la détection de la présence de lymphocytes T spécifiques de complexes antigène-CMH dans un échantillon biologique, comprenant la mise en contact dudit échantillon avec un exosome marqué tel que défini ci-avant, comportant ledit complexe antigène-CMH, et la mise en évidence du marquage de lymphocytes T dans ledit échantillon.

De plus, la détection de ces lymphocytes T permet non seulement la détection et donc le diagnostic d'un état physiopathologique, mais également de suivre par exemple l'efficacité de protocoles d'immunisation et l'état de la réponse immunitaire à différents stades de la maladie et d'évaluer ainsi l'efficacité des thérapeutiques entreprises.

Dans une application particulière, les exosomes de l'invention portant un récepteur TcR sont utilisés pour la détection de complexes peptide-CMH spécifiques de ce récepteur dans un échantillon biologique.

Par ailleurs, les exosomes fluorescents selon l'invention portant n'importe quel type de protéine de composition définie représentent également des sondes fluorescentes permettant la détection de récepteurs potentiels. Le champ nouveau des exosomes est ainsi généralisable à la mise en évidence, *in vivo*, de toute interaction protéine/protéine de faible affinité. L'invention a donc également pour objet l'utilisation d'exosomes, de préférence marqués, notamment fluorescents, tels que décrits ci-avant,

- pour la détection de récepteurs spécifiques d'une molécule protéique dans un échantillon biologique. Dans ce mode de mise en oeuvre, les exosomes utilisés comportent donc, à leur surface, ladite molécule biologique de structure définie.

- pour la détection de la présence d'un ligand dans un échantillon biologique. Dans ce mode de mise en oeuvre, les exosomes utilisés comportent donc, à leur surface, un récepteur spécifique dudit ligand.

### c) Applications thérapeutiques

Les anticorps restreints ou des fragments de ces derniers sont potentiellement capables d'inhiber l'interaction entre le récepteur d'un lymphocyte T et le complexe CMH-peptide pour lequel il est spécifique. De façon parallèle, les exosomes portant à leur surface un seul type de complexe CMH-peptide peuvent, en interagissant avec les lymphocytes T spécifiques de ces complexes, entrer en compétition avec leurs ligands naturels, les lymphocytes T et entraîner leur inactivation.

Les anticorps restreints et les exosomes peuvent donc être employés dans toutes les situations où l'on souhaite réduire ou supprimer une réponse immunitaire médiée par des lymphocytes T qui s'avère délétère pour l'organisme comme c'est le cas par exemple dans :

- les transplantations d'organes ou les greffes de moelles dans lesquelles on cherche à neutraliser la réponse de l'hôte contre le greffon, généralement au moyen de fortes doses d'agents immunosuppresseurs ;
- les maladies auto-immunes ou les pathologies virales pendant lesquelles la réponse immunitaire T CD8 ou CD4 aboutit de manière chronique à la destruction des tissus ;
- les allergies et l'asthme.

Dans ce type de pathologies, les exosomes de l'invention exprimant à leur surface un complexe défini peptide-MHC, dont l'implication est connue dans le développement de la situation pathologique, peuvent donc être utilisés pour bloquer le développement de la réponse immune et donc le développement de la réponse pathologique.

Les exosomes de l'invention portant des complexes CMH-peptides peuvent également être utilisés pour l'amplification (l'expansion) de population de lymphocytes T cytotoxiques ex vivo. Utilisés directement à partir de prélèvement sanguins, ils peuvent ainsi être la base de thérapies cellulaires contre différentes cibles cellulaires. Ainsi les exosomes peuvent servir à trier des cellules T spécifiques de combinaisons variées de complexes exprimés par des cellules qui représentent une cible thérapeutique, comme les cellules tumorales ou infectées

par un virus. Un autre objet de l'invention réside donc dans l'utilisation des exosomes décrits ci-avant pour l'amplification clonale et/ou la stimulation de lymphocytes T cytotoxiques et/ou auxiliaires. L'invention concerne également une méthode pour l'amplification (ou l'expansion) clonale ex vivo de lymphocytes  
5 T, notamment cytotoxiques, comprenant la mise en contact d'un échantillon biologique comprenant des lymphocytes T avec des exosomes tels que décrits ci-avant, comportant un complexe peptide-CMH défini, la récupération des lymphocytes T spécifiques et leur amplification. Cette méthode est tout particulièrement avantageuse pour l'amplification clonale de lymphocytes T  
10 cytotoxiques spécifiques de complexes entre des molécules CMH et des peptides d'antigènes tumoraux ou viraux.

Une autre application particulièrement intéressante des vésicules selon l'invention réside dans le transfert des molécules vers les cellules. En effet, de part leur composition, les vésicules de l'invention sont capables de jouer le rôle  
15 de vecteur de transfert de molécules vers les cellules, in vitro, ex vivo et in vivo. A cet égard, l'invention concerne l'utilisation des exosomes tels que décrits ci-avant, comportant une substance d'intérêt, pour la préparation d'une composition destinée au transfert de ladite substance dans une cellule. Avantageusement, il s'agit d'un exosome comportant un récepteur de ligand ou un ligand de récepteur  
20 à sa surface, permettant ainsi d'orienter le transfert vers une ou des populations cellulaires choisies. L'invention concerne également une méthode pour le transfert d'une substance dans une cellule, in vitro, ex vivo ou in vivo, comprenant la mise en contact de ladite cellule avec une vésicule selon l'invention comportant ladite substance. Plus préférentiellement, la vésicule  
25 utilisée exprime en outre un récepteur de ligand et la méthode de l'invention permet un transfert orienté de la substance vers des cellules exprimant le ligand correspondant. Pour une mise en oeuvre in vivo, les vésicules de l'invention sont administrées à un sujet (de préférence un mammifère, notamment l'homme), par toute voie d'administration classique (injection intraveineuse, intraartérielle,  
30 intramusculaire, sous-cutanée, etc.). Pour une utilisation in vitro ou ex vivo, les cellules sont contactées par incubation dans un dispositif approprié (boîte,

flasque, poche, ampoule, etc.), de préférence en conditions stériles. Les paramètres de l'étape de mise en contact (quantité de vésicule, durée de contact, température, milieu, etc.) peuvent être aisément ajustés par l'homme du métier en fonction des buts poursuivis et de l'enseignement de la présente demande.

#### d) Applications dans le domaine de la recherche

Elles concernent bien entendu toutes les applications évoquées plus haut dans l'analyse des mécanismes moléculaires de la présentation antigénique par l'utilisation d'anticorps permettant de détecter et d'analyser les différentes étapes de la formation de complexes CMH-peptides dans différentes situations normales ou pathologiques.

Par ailleurs, elles concernent aussi l'analyse et la caractérisation moléculaire des populations de lymphocytes T capables de reconnaître un complexe CMH-peptide déterminé par l'utilisation des exosomes fluorescents dans leur capacité à détecter de manière de récepteurs T aux complexes CMH-peptide.

D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs. En outre, toutes les publications citées dans la demande sont incorporées à la présente par référence.

#### Légendes des figures

Figure 1 : Production de complexes CMH-peptide DR1-HA fonctionnels dans la lignée RBL2H3.

A. Analyse de l'expression de surface par cytométrie de flux des molécules du CMH II humaine DR1 avant (gauche) et après (droite) transfection des ADNc codant pour les chaînes a et b de DR1 dans la lignée RBL 2H3. Les molécules DR1 sont détectées par l'anticorps L243 (trait noir) lui-même révélé par un sérum de chèvre anti-IgG de souris couplé au FITC.



**B.** Expression de surface de DR1 dans la lignée exprimant une chaîne invariante (liHA) où le peptide CLIP a été remplacé par le peptide 308-319 issu de l'hémagglutinine du virus de la grippe. Les molécules DR1 sont détectées sur la lignée RBL DR1liHA et un lymphocyte B transformé par l'EBV (Hom2) de même haplotype par l'anticorps L243 (trait noir).

**C.** Stimulation de lymphocytes T spécifiques du complexe DR1-HA par la lignée RBL exprimant ce complexe ou des B-EBV de même haplotype. Les lignées RBL DR1liHA et B-EBV Hom2 étaient diluées dans des plaques de culture avec un lymphocyte T spécifique du complexe DR1HA. La lignée B-EBV Hom2 était aussi incubée en présence de concentration saturante (10mM) du peptide HA. La production d'IL2 dans les surnageants de culture permet d'évaluer la stimulation des lymphocytes THA (lymphocytes T spécifiques du peptide HA). L'IL2 est mesurée par l'intermédiaire d'un test d'incorporation de thymidine tritiée de la lignée CTLL2 dont la prolifération est IL2-dépendante.

**D.** Analyse de la saturation en peptide HA de la lignée RBL DR1 liHA. Les cellules Hom2 et RBL DR1liHA étaient incubées (100 cellules par puits) en présence de concentrations croissantes du peptide HA et des lymphocytes THA. La stimulation des lymphocytes a été évaluée comme précédemment.

**Figure 2 :** Accumulation des molécules DR1 dans un compartiment de sécrétion de RBL2H3.

**A.** Analyse du site intracellulaire d'accumulation des molécules DR1 dans RBL 2H3. Les cellules RBL DR1HA ont été fixées avec 0,5% glutaraldéhyde puis perméabilisées avec 0,05% Saponine. Les molécules DR1 et la chaîne invariante ont été détectées respectivement avec les anticorps L243 et PIN1 puis un sérum d'âne anti-IgG de souris couplé au FITC. La sérotonine a été détectée grâce à un sérum de lapin spécifique révélé avec un sérum d'âne anti-IgG de lapin couplé au Texas red. Les images ont été obtenues par microscopie confocale (Leica). L'épaisseur des plans de coupe étaient de 0,5 micron.

B. Purification des exosomes de RBL DR1liHA. Après lavage dans du DMEM, les cellules ont été incubées pendant 30 minutes en présence de 1mM de ionomycine à 37°C. Les exosomes ont été purifiés par ultracentrifugation différentielle à partir du surnageant des cellules. Le culot d'exosomes, remis en suspension dans du PBS, a été séparé (5 mg ) par SDS-PAGE puis transféré sur une membrane de Nylon. La chaîne b de DR1 a été détectée avec l'anticorps monoclonal IB5 dans la préparation d'exosome et en contrôle dans les lysats des cellules RBLDR1HA et Hom2 (équivalent de 10<sup>5</sup> cellules par puits) migrés dans les mêmes conditions.

10

Figure 3 : Utilisation des exosomes pour la production d'anticorps anti-DR1HA

A. Des dilutions croissantes des sérums des souris immunisées avec les exosomes ont été incubés avec les cellules RBL exprimant (droite) ou non (gauche) les molécules DR1HA. Le marquage, ainsi obtenu, a été analysé par cytométrie de flux.

B. Les sérums des rats (dilués au 1/100) immunisés avec les exosomes ont été incubés avec les cellules RBL exprimant ou non (gauche) les molécules DR1HA. A droite, les cellules exprimant DR1 ont été préalablement incubées ou non pendant deux heures à 37°C avec 10mM du peptide HA puis avec la même dilution du sérum des rats immuns.

C. La rate du rat immun a été fusionnée avec la lignée X63A8 dans des conditions classiques de fabrication d'anticorps monoclonaux. Le surnageant des différents hybridomes a été testé par immunofluorescence sur les cellules RBL2H3 exprimant ou non les molécules DR1 ou DR1HA. Les clones a40, b82 et a15 sont des exemples représentatifs des anticorps obtenus.

Figure 4 : Utilisation des exosomes pour la détection des lymphocytes T spécifiques du complexe DR1HA

A. Les cellules RBL DR1liHA ont été incubées en présence de 5mM de « Green Tracker » (lipide fluorescent s'accumulant dans les compartiments

30

lysosomaux des cellules) pendant 30 minutes à 37°C puis lavées et réincubées pendant une heure à 37 °C en absence de marqueur fluorescent. Les cellules ont été fixées (3% paraformaldéhyde), puis analysées par microscopie confocale.

5        **B.** En parallèle, les exosomes DR1HA ont été purifiés à partir des cellules décrites en A. La fluorescence présente dans les échantillons a été quantifiée à l'aide d'un fluorimètre et visualisée directement par microscopie confocale.

10        **C.D.** Les exosomes fluorescents DR1 HA ont été incubés à 50mg/ml avec des lymphocytes THA spécifiques du complexe DR1HA ou des lymphocytes TH30 spécifiques d'un autre complexe (D) pendant deux heures à 37°C en présence d'azide pour bloquer l'internalisation. La fluorescence des cellules a été évaluée par cytométrie de flux.

## 15        **Matériels et Méthodes**

### Cellules

20        Les cellules utilisées pour la production d'exosomes dans la partie expérimentale sont des cellules de mastocytes murins. Plus particulièrement, une lignée tumorale de basophiles au phénotype de mastocytes muqueux, désignée RBL-2H3, a été utilisée (Barsumian et al, Eur. J. Immunol. (11 (1981) 317). D'autres cellules de mastocytes, en particulier établies en lignée, peuvent être utilisées, telles que des lignées dérivées des cellules RBL (Rat Basophilic

25        Leukemia), déposées à l'ATCC sous le numéro CRL1378 (Kulczycki et al., J. Exp. Med. 139 (1974) 600).

Des lignées lymphocytaires T capables de reconnaître un antigène particulier dans un contexte CMH II humain (DR1) ont également été utilisées. En particulier, la lignée Jurkatt transfectée avec l'ADNc codant le récepteur des

30        cellules T ("T-HA") spécifique du peptide 306-318 de l'Hémagglutinine du virus de l'influenza en association avec HLA-DR1 (Sidhu et al., J. Exp. Med. 176

(1992) 875). La lignée de cellules B humaines transformées par le virus d'Epstein Barr (lignée Hom-2) a été utilisée comme contrôle pour la réponse restreinte à HLA-DR1.

5 Les cellules ont été cultivées en milieu DMEM (Gibco BRL), RPMI, ou "CLICK" : milieu RPMI supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Sigma), 1 mg/ml de pénicilline-streptomycine, 1 mg/ml de glutamine, 5 mM de pyruvate de sodium et 50  $\mu$ M de b-mercaptoéthanol. Tout autre milieu adapté à la culture de cellules eucaryotes, notamment mammifères, peut bien entendu être utilisé.

10 Les cellules ont été principalement cultivées en flacon de culture de 25 ou 15 cm<sup>3</sup>. Les cellules RBL-2H3 étant des cellules adhérentes, elles sont décollées du support grâce à l'action de la Trypsine-EDTA (Seromed). Afin de produire ces dernières en grandes quantités, il est également possible de les  
15 cultiver en "spinner", à la densité de 10<sup>6</sup> cellules/ml.

### Plasmides

Pour modifier génétiquement les cellules de mastocytes, les constructions  
20 génétiques suivantes ont été réalisées.

Les ADNc codant pour la chaîne HLA-DR1 $\alpha$  humaine (Larhammer et al., Cell 30 (1982) 153), la chaîne HLA-DR1 $\beta$  humaine (Bell et al., PNAS 82 (1985) 3405) et la chaîne invariante humaine p33 li (Claesson et al., PNAS 80 (1983) 7395) ont été isolés. L'ADNc codant pour la chaîne invariante p33li a ensuite été  
25 modifié par PCR pour remplacer la région codant pour le peptide CLIP (résidus 87-102) par un site de restriction. Cet ADNc permet ainsi d'insérer, en lieu et place du peptide CLIP, tout fragment d'ADNc d'intérêt codant pour un peptide antigénique (Stumptner et al., EMBO J. 16 (1997) 5807). Dans un exemple  
30 précis, un fragment d'ADN codant pour le peptide HA308-319 de

l'hémagglutinine du virus de la grippe a été inséré dans cet ADNc, codant pour un polypeptide chimère li(HA308-319).

Les acides nucléiques décrits ci-dessus ont ensuite été clonés, séparément, dans le plasmide pSR $\alpha$  sous le contrôle du promoteur SR $\alpha$  (Takebe et al., Mol. Cell Bio. 8 (1988) 466). Chacun des plasmides a ensuite été modifié de manière à incorporer un gène de résistance différent, permettant une sélection pour chacun des plasmides, et donc pour chacune des chaînes ; la chaîne  $\alpha$  avec le gène de résistance à la néomycine ; la chaîne  $\beta$  avec le gène de résistance à l'hygromycine, et la chaîne invariante avec le gène de résistance à la zéocine.

### Transfections

Pour introduire les différents acides nucléiques dans les cellules de mastocytes, les vecteurs plasmidiques correspondants ont été linéarisés par l'enzyme de restriction Scal. 50 $\mu$ g de chaque plasmide ont été linéarisés puis précipités à l'éthanol, et les culots ont été resuspendus en présence de cellules RBL-2H3 à une concentration de  $1.10^7$  cellules/ml. Des transformants stables ont été obtenus par électroporation de  $5.10^6$  cellules au moyen d'un "gene pulser" (Bio-Rad, Richmond, CA) dans les conditions suivantes : 260V, 960  $\mu$ F. 72 heures après l'électroporation, les transfectants sont sélectionnés par culture en milieu de sélection comprenant 250  $\mu$ G/ml de G418 (Généticine, Gibco) 1mg/ml d'hygromycine et 500 $\mu$ g/ml de zéocine. Après 8 jours de culture en milieu de sélection, 60 à 90% des cellules présentes sont transfectées. Les transfectants ont ensuite étéensemencés sur boîte de petri en milieu de sélection à une concentration permettant l'apparition de colonies adhérentes individualisées. Les clones ainsi obtenus ont été prélevés et mis en culture séparément. Ces clones peuvent être conservés sous forme congelée, en vue d'une utilisation ultérieure.

### **Résultats**

## 1-Production d'exosomes DR1HA

### 1.1. Construction et caractérisation de cellules productrices génétiquement 5 modifiées

Afin de produire, de manière contrôlée, des exosomes portant des complexes CMH-peptide de composition définie, les chaînes a et b des molécules de classe II du CMH, DR1, ont été exprimées dans la lignée  
10 mastocytaire RBL2H3, issue d'une leucémie à basophile du Rat. Pour cela, deux vecteurs portant respectivement un acide nucléique codant pour chaque chaîne, sous contrôle du promoteur SRa ont été transfectés simultanément dans les cellules (voir matériels et méthodes). Les résultats obtenus par cytométrie de flux montrent que les cellules transfectées expriment bien les molécules DR1 (Figure  
15 1A).

Ces cellules RBL-2H3 DR1 ont ensuite été sensibilisées à un peptide donné, de composition précise, afin de générer des complexes CMH-peptide de composition définie. Pour cela, différentes techniques peuvent être envisagées.  
20 Dans un mode de réalisation simple, le peptide peut être incubé directement avec les exosomes. Dans une autre variante, un acide nucléique codant pour le peptide peut être introduit dans les cellules, de manière à exprimer également ce peptide. Dans cet exemple particulier de mise en oeuvre, pour fabriquer une cellule présentatrice comportant une seule spécificité antigénique, le peptide  
25 antigénique choisi a été introduit dans les cellules sous forme d'une fusion génétique avec la chaîne invariante humaine Ii. Plus particulièrement, le peptide CLIP de la chaîne invariante a été remplacé par la séquence du peptide choisi, issu de l'hémagglutinine (HA 308-319) du virus de la grippe, connu pour se lier avec la molécule DR1. Cette construction (IiHA) a été transfectée dans les  
30 cellules dans les conditions décrites dans les Matériels et Méthodes. La chaîne hybride exprimée dans les cellules RBL-2H3 DR1, a permis construire des

cellules qui expriment des molécules DR1 reconnues par l'anticorps L243 à un niveau similaire qu'une lignée B-EBV (Hom2) contrôle d'haplotype DR1 (Figure 1B). Ces résultats montrent donc que les cellules de mastocytes de l'invention expriment bien un complexe peptide-CMH humain fonctionnel, de composition  
5 prédéterminée et contrôlée.

Le caractère fonctionnel des complexes peptide-CMH exprimé par les cellules de l'invention a été confirmé dans un test de stimulation de lymphocytes T spécifiques de la combinaison DR1-HA portée par les cellules. Pour cela, les  
10 cellules de l'invention ont été incubées en présence de lymphocytes THA, et la stimulation a été déterminée par mesure de l'interleukine-2 libérée dans le surnageant, par un test de croissance d'une lignée cellulaire IL-2-dépendante. Comme contrôle, une lignée de lymphocytes B transformée par l'EBV (Hom-2), d'haplotype DR1, pulsée par une concentration saturante (10mM) du peptide HA  
15 a été utilisée.

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 1C et 1D. Ils montrent que les cellules de mastocyte de l'invention expriment un complexe DR1-HA, capable de stimuler un lymphocyte T spécifique de cette combinaison. Ils  
20 montrent également que la stimulation obtenue en présence des cellules de l'invention est plus efficace que celle produite par les cellules contrôle (B-EBV d'haplotype DR1) pulsées par une concentration saturante (10mM) du peptide HA. Enfin, les résultats obtenus montrent que les molécules DR1 semblent ne présenter que le peptide HA puisque l'addition d'une concentration saturante de  
25 peptide n'augmente pas de manière significative la capacité des cellules RBL DR1liHA à stimuler un lymphocyte T HA (Figure 1D).

L'ensemble de ces résultats démontre donc le caractère fonctionnel des complexes peptide-CMH produits. Ils illustrent également le caractère spécifique  
30 des cellules obtenues, et donc le caractère spécifique du procédé de l'invention,

qui permet d'obtenir des cellules (et des exosomes) portant des molécules de composition définie et contrôlée.

## 1.2. Production des exosomes fonctionnalisés

5

Une étude par immunofluorescence a permis de montrer que les complexes recombinants CMH-peptide (DR1HA) s'accumulent dans les granules de sécrétion de la lignée cellulaire RBL-2H3. La Figure 2A témoigne en effet de la colocalisation des molécules DR1 avec la sérotonine dans des structures intracellulaires vésiculaires.

10

La possibilité que des exosomes fonctionnels puissent être relargués par ces cellules a donc été étudiée. Pour cela, les cellules ont été cultivées en présence d'un ionophore calcique, et la production de vésicules membranaire a été suivie. Plus particulièrement, les cellules ont été centrifugées à 300 g pendant 5 minutes à température ambiante. Sur chaque culot cellulaire, une solution de ionophore calcique (ionomycine 1mM) a été ajoutée (environ 300 µl) et l'incubation a été poursuivie pendant 30 minutes à 37°C. L'exocytose a été stoppée par refroidissement rapide dans la glace et ajout de 300 µl d'une solution froide PBS-EGTA 1mM. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 300g à 4°C pendant 5 minutes. Les surnageants ont été récupérés et recentrifugés, tout d'abord 5 minutes à 1200 g, puis 5 minutes à 10 000 g, puis enfin 1 heure à 70 000 g. Après cette centrifugation différentielle, les culots (comprenant les exosomes) sont repris et solubilisés dans une solution tampon (30µl de tampon de Laemmli-DDT (1X ou 2X)). Une fraction des culots est également solubilisée dans un tampon de lyse pour déterminer la concentration protéique. Les solutions d'exosomes peuvent être séparées par migration sur gel (mini-gel 12% de polyacrylamide) à 20mA puis transférées sur Immobilon. L'analyse des exosomes est ensuite réalisée par western blotting avec des anticorps spécifiques des différentes chaînes des molécules de classe II du CMH.

30



Les résultats obtenus montrent que des exosomes peuvent être relargués de la lignée RBL-2H3, de manière importante, après stimulation par un agent approprié. Ces exosomes peuvent être isolés et purifiés par exemple par ultracentrifugation différentielle pour la préparation de composition d'exosomes.

5 Enfin, les résultats présentés sur la Figure 2B démontrent que ces exosomes sont fonctionnels. En effet, les analyses par western blotting montrent que les exosomes obtenus expriment les différentes chaînes recombinantes des molécules de classe II du CMH. En outre, ces résultats montrent également la forte densité des complexes peptide-CMH à la surface des exosomes de

10 l'invention.

Les exemples qui suivent illustrent notamment l'utilisation des exosomes DR1HA pour la production d'anticorps spécifiques de cette combinaison et la capacité des exosomes DR1HA à lier des lymphocytes T spécifiques de cette

15 même combinaison.

## 2 - Génération d'anticorps spécifiques du complexe DR1HA

Cet exemple illustre l'utilisation des exosomes de l'invention pour la

20 production d'anticorps, en particulier d'anticorps dits "restreints", c'est-à-dire spécifiques du peptide antigénique en association avec la molécule du CMH. Cet exemple illustre notamment le pouvoir immunogène très important des exosomes de l'invention, puisqu'ils permettent la production d'anticorps en l'absence de tout adjuvant.

25 Les exosomes purifiés à partir du surnageant des cellules RBL DR1HA (exemple 1) ont été remis en suspension dans du PBS. Ces exosomes ont ensuite été utilisés pour immuniser des souris Balb/c ou des rats LOU en absence de tout adjuvant, selon les protocoles suivants :

30 - Les souris ont été injectées par voie sous cutanée avec 10µg d'exosomes, deux fois à trois semaines d'intervalle, puis 30µg par voie

intrapéritonéale et enfin 30 µg par voie intraveineuse 3 jours avant le prélèvement des sérums.

- Les rats ont été injectés avec des exosomes par voie intrapéritonéale (10µg), par deux reprises à trois semaines d'intervalle, puis par  
5 voie intraveineuse (50µg) trois jours avant le prélèvement des sérums.

Comme le montre la Figure 3A, les sérums prélevés chez les souris immunisées présentaient une très forte réactivité contre la lignée RBL exprimant ou non le complexe DR1HA mais qui était détectable jusqu'à une dilution au  
10 trente millième des sérums seulement dans le cas de la cellule DR1HA.

Comme le montre la Figure 3B, les sérums des rats ainsi immunisés, montraient, de manière surprenante, une réactivité contre la lignée RBL exprimant le complexe DR1HA alors que les mêmes sérums réagissaient avec  
15 une plus faible intensité avec la lignée initiale RBL-2H3. En outre, l'addition du peptide HA à des cellules exprimant DR1 (RBL-2H3 DR1) augmente de manière significative la réactivité des antisérums ainsi produits (Figure 3B).

Ces résultats montrent donc que les exosomes de la lignée RBL sont  
20 capables d'induire une réponse anticorps qui, de manière inattendue, est principalement dirigée chez le rat contre les complexes DR1HA.

Les rates des rats immuns ont été fusionnées avec des cellules de la lignée X63A8. Les hybridomes ainsi obtenus ont été triés par dilution clonale,  
25 selon les techniques classiques d'immunologie, puis sélectionnés par immunofluorescence pour la spécificité des anticorps monoclonaux produits. Différents anticorps monoclonaux ont ainsi été obtenus, pour certains dirigés contre des protéines de la lignée RBL, pour d'autres, contre des déterminants monomorphiques des molécules de classe II humaine d'haplotype DR1 et enfin  
30 contre le complexe constitué par les molécules DR1 associées au peptide issu de la protéine HA du virus de la grippe (Figure 3C). Ces derniers anticorps

monoclonaux constituent des anticorps restreints, et possèdent donc des propriétés particulièrement avantageuses pour des applications diagnostiques ou thérapeutiques.

### 5            3 - Détection de lymphocytes T spécifiques du complexe DR1HA

10            Cet exemple illustre l'utilisation des exosomes de l'invention pour la détection de lymphocytes T spécifiques dans un échantillon biologique. Cet exemple montre également comment les exosomes peuvent être utilisés pour sélectionner et amplifier une population de lymphocytes T particuliers, en vue notamment de leur réinjection à un sujet (thérapie cellulaire). Cette approche peut bien entendu être étendue à l'utilisation des anticorps restreints décrits dans l'exemple 2, ainsi qu'à la détection de tout récepteur spécifique d'un ligand.

15            Pour la mise en oeuvre de cette application, des exosomes marqués ont été produits. Pour cela, avant purification des exosomes de la lignée DR1HA, celle-ci a été incubée avec un traceur fluorescent s'accumulant très fortement dans les exosomes contenus dans les granules de sécrétion. Le marqueur utilisé, "Green Tracker", est un lipide fluorescent qui s'accumule dans les lysosomes des cellules. L'analyse en microscopie confocale des cellules, après  
20            fixation, montre la présence du marquage fluorescent dans les granules de sécrétion des cellules (Figure 4A). Les exosomes fluorescents ont ensuite été produits et purifiés à partir de ces cellules, dans les conditions décrites dans l'exemple 1. Rendus ainsi fluorescents, ces exosomes (Figure 4B) ont été utilisés  
25            pour détecter, dans un échantillon biologique, la présence de lymphocytes T spécifiques de la combinaison DR1 HA (lymphocytes THA). Il est entendu que tout autre marquage peut être utilisé dans le cadre de l'invention, appliqué soit sur les cellules productrices, soit sur les exosomes produits.

30            Pour cela, les exosomes ont été incubés en présence d'un échantillon de lymphocytes THA et de lymphocytes TH30, spécifiques d'un autre complexe. Les

résultats obtenus par cytofluorométrie de flux montrent que les exosomes exprimant les DR1HA se lient, de manière spécifique, aux lymphocytes THA (Figure 4C) alors que ces mêmes exosomes sont incapables de reconnaître des lymphocytes possédant une autre spécificité (Figure 4D). Ces résultats  
5 démontrent la capacité unique et inattendue des exosomes produits par la lignée mastocytaire selon l'invention de détecter des lymphocytes T spécifiques de ce même complexe. Cette application peut être mise en oeuvre à partir de tout type d'échantillon biologique.

10 En outre, cette technologie peut être appliquée de la même façon à la fabrication et à l'utilisation d'exosomes exprimant des complexes CMH-peptide. La présente invention permet ainsi de détecter, à la surface de cellules présentatrices, voire de cellules tumorales, la présentation, par les molécules de classe I et de classe II du CMH, de peptides issus d'antigènes exprimés par les  
15 tumeurs. La présente invention permet également de détecter voire de purifier les lymphocytes T capables de reconnaître ces mêmes complexes. Ils peuvent ainsi permettre d'amplifier une population de lymphocytes T spécifiques d'un complexe peptide-CMH particulier, par exemple une population de lymphocytes CTL, en vue de leur utilisation thérapeutique. En effet, différentes approches  
20 d'immunothérapies de cancers ou d'infections virales, par exemple, ont été développées, basées sur le prélèvement, chez un sujet, de lymphocytes et sur l'expansion ex vivo de clones particuliers de lymphocytes T spécifiques d'un antigène impliqué dans la pathologie (antigène tumoral ou viral, par exemple). Ces clones amplifiés sont ensuite réadministrés au sujet, comme agent  
25 thérapeutique. La présente invention permet de faciliter grandement la sélection et l'amplification des clones spécifiques de lymphocytes T, et donc le potentiel et la mise en oeuvre de ces approches thérapeutiques.

## REVENDEICATIONS

1. Vésicule membranaire, caractérisée en ce qu'elle comporte une molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité.

5        2. Vésicule selon la revendication 1 caractérisée en ce que la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité est une molécule de classe II.

3. Vésicule selon la revendication 2 caractérisée en ce que la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II est une  
10 chaîne  $\alpha$ .

4. Vésicule selon la revendication 2 caractérisée en ce que la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II comprend une chaîne  $\alpha$  et une chaîne  $\beta$ .

5. Vésicule selon l'une des revendications 2 à 4 caractérisée en ce que la  
15 molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II est choisie parmi les sérotypes DR1 à DR13, de préférence DR1 à DR7.

6. Vésicule selon la revendication 1 caractérisée en ce que la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité est une molécule de classe I.

20        7. Vésicule selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisée en ce qu'elle comporte un complexe entre un peptide défini et la molécule recombinante du complexe majeur d'histocompatibilité.

8. Vésicule selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre une ou plusieurs molécules hétérologues d'intérêt.

25        9. Vésicule selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre un peptide ou une protéine recombinant permettant sa purification.

10. Vésicule selon les revendications précédentes caractérisées en ce qu'elle comporte un marqueur.

30        11. Vésicule selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement dépourvue de molécules du CMH endogène.

12. Vésicule membranaire caractérisée en ce qu'elle est obtenue à partir d'une cellule de mastocyte ou dérivée de mastocyte, et en ce qu'elle comporte une ou plusieurs molécules hétérologues d'intérêt.

13. Vésicule selon la revendication 12, caractérisée en ce que la molécule d'intérêt est une protéine, un polypeptide, un peptide, un acide nucléique, un lipide ou une substance de nature chimique, biologique ou synthétique.

14. Vésicule membranaire selon la revendication 13, caractérisée en ce que la molécule hétérologue est une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité, un antigène, un ligand de récepteur, un récepteur de ligand, un acide nucléique, un produit pharmacologique, un marqueur et/ou un peptide de purification.

15. Vésicule selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle exprime un récepteur de ligand et en ce qu'elle comporte une autre molécule hétérologue d'intérêt.

16. Vésicule membranaire, caractérisée en ce qu'elle comporte deux molécules du CMH de classe II d'haplotypes différents.

17. Cellule productrice d'exosomes, caractérisée en ce qu'elle comporte un ou plusieurs acides nucléiques recombinants codant pour une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité.

18. Cellule selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de mastocyte.

19. Cellule selon la revendication 18, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une lignée mastocytaire d'une leucémie à basophile, notamment de la lignée RBL, de préférence RBL-2H3.

20. Cellule selon l'une des revendications 17 à 19, caractérisée en ce qu'elle comporte un acide nucléique recombinant codant pour une chaîne  $\alpha$  et/ou une chaîne  $\beta$  d'une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II et/ou pour une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I.

21. Procédé de production d'un exosome comportant une molécule recombinante définie, comprenant les étapes suivantes:

a) la culture d'une cellule de mastocyte ou dérivée de mastocyte comportant un acide nucléique recombinant codant pour ladite molécule recombinante définie,

c) la récupération des exosomes produits par lesdites cellules, ces  
5 exosomes comprenant ladite molécule recombinante définie.

22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'il comprend une étape intermédiaire b) au cours de laquelle les cellules sont stimulées pour induire et/ou augmenter la sécrétion des exosomes.

23. Procédé selon la revendication 21 ou 22 caractérisé en ce que la  
10 molécule recombinante définie est exposée à l'extérieur de l'exosome, ou est incluse, en partie ou en totalité, dans la fraction cytosolique de l'exosome.

24. Procédé selon l'une des revendications 21 à 23, caractérisé en ce que la molécule recombinante est une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité, une molécule antigénique, un ligand de récepteur, un  
15 récepteur de ligand, un peptide de purification ou tout autre polypeptide d'intérêt.

25. Procédé selon l'une des revendications 21 à 24 caractérisé en ce que l'acide nucléique comprend en outre une région codant pour un signal d'adressage vers les compartiments membranaires du mastocyte.

26. Procédé de préparation d'un exosome comportant un complexe  
20 peptide-CMH de composition définie, caractérisé en ce qu'il comprend:

- la culture d'une cellule productrice d'exosomes comprenant un ou plusieurs acides nucléiques recombinants codant pour une molécule recombinante définie du CMH,

- la stimulation des cellules pour induire une libération des  
25 exosomes,

- la récupération des exosomes produits par lesdites cellules, ces exosomes exprimant à leur surface ladite molécule recombinante définie du CMH, et,

- la mise en contact des exosomes avec le ou les peptides.

30 27. Procédé de préparation d'un exosome comportant un complexe peptide-CMH de composition définie, caractérisé en ce qu'il comprend:

- la culture d'une cellule productrice d'exosomes comportant un ou plusieurs acides nucléiques recombinants codant pour une molécule recombinante définie du CMH et un acide nucléique comprenant une région codant pour un peptide recombinant défini,

5                   - la stimulation des cellules pour induire une libération des exosomes,

- la récupération des exosomes produits par lesdites cellules, ces exosomes exprimant à leur surface ladite molécule recombinante définie du CMH associée audit peptide recombinant.

10           28. Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce que l'acide nucléique codant pour le peptide recombinant code pour un dérivé de la chaîne invariante II, dans lequel la région CLIP a été déléetée et substituée par ledit peptide.

29. Procédé selon l'une des revendications 26 à 28 caractérisé en ce que  
15 la cellule productrice est une cellule de mastocyte ou dérivée de mastocyte.

30. Procédé selon l'une des revendications 26 à 29 caractérisé en ce que la cellule productrice est essentiellement dépourvue de molécule du CMH endogène.

31. Procédé de modification de la composition d'un exosome, comprenant  
20                   - l'introduction dans une cellule productrice d'exosomes d'un acide nucléique codant pour une molécule définie, liée à un signal d'adressage dans les compartiments membranaires, et,

- la production d'exosomes à partir de ladite cellule.

32. Composition comprenant une ou plusieurs vésicules membranaires  
25 selon l'une des revendications 1 à 16.

33. Utilisation d'une vésicule selon l'une des revendications 1 à 16 pour la production d'anticorps, polyclonaux et/ou monoclonaux.

34. Procédé de production d'anticorps, comprenant l'immunisation d'un animal avec une vésicule selon la revendication 7 et la récupération des  
30 anticorps et/ou des cellules produisant des anticorps ou impliquées dans la réponse immunitaire.



35. Procédé selon la revendication 34, pour la production d'anticorps monoclonaux, notamment spécifiques de l'association CMH-peptide.

36. Utilisation d'un anticorps obtenu selon la revendication 34 ou 35, ou d'un fragment d'un tel anticorps, pour la détection, dans un échantillon  
5 biologique, de la présence d'antigènes spécifiques correspondants.

37. Utilisation d'un anticorps produit selon la revendication 34 ou 35, d'un fragment d'un tel anticorps, ou d'une vésicule selon la revendication 1 pour la préparation d'une composition thérapeutique destinée à inhiber l'interaction entre le récepteur d'un lymphocytes T et le complexe CMH-peptide pour lequel il est  
10 spécifique.

38. Utilisation d'une vésicule membranaire selon l'une des revendications 1 à 16 pour la détection de partenaires spécifiques d'une molécule protéique dans un échantillon biologique.

39. Utilisation selon la revendication 38 d'un exosome portant un  
15 complexe CMH-peptide pour la détection de lymphocytes T spécifiques de ce complexe dans un échantillon biologique.

40. Utilisation selon la revendication 38 d'un exosome portant un récepteur TcR pour la détection de complexes peptide-CMH spécifiques de ce récepteur dans un échantillon biologique.

20 41. Utilisation selon la revendication 38 d'un exosome portant un récepteur de ligand pour la détection de la présence dudit ligand dans un échantillon biologique.

42. Méthode pour la détection de la présence de lymphocytes T spécifiques de complexes antigène-CMH dans un échantillon biologique,  
25 comprenant la mise en contact dudit échantillon avec un exosome marqué selon la revendication 7, comportant ledit complexe antigène-CMH, et la mise en évidence du marquage de lymphocytes T dans ledit échantillon.

43. Utilisation d'une vésicule selon la revendication 7 pour l'amplification clonale et/ou la stimulation ex vivo de lymphocytes T cytotoxiques ou auxiliaires.

44. Utilisation d'une vésicule selon l'une des revendications 11 à 16 pour la préparation d'une composition destinée au transfert de ladite molécule dans une cellule.

Figure 1

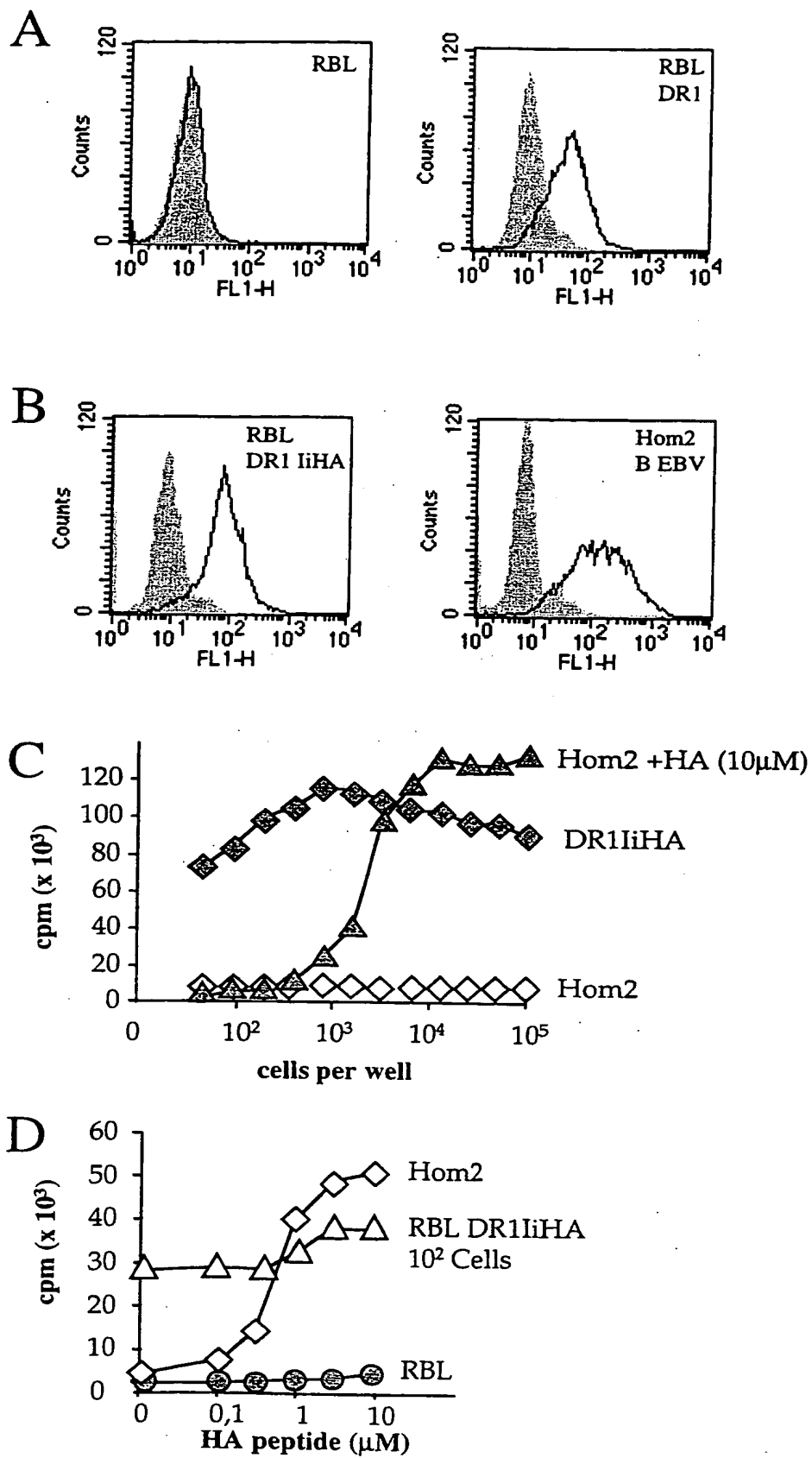
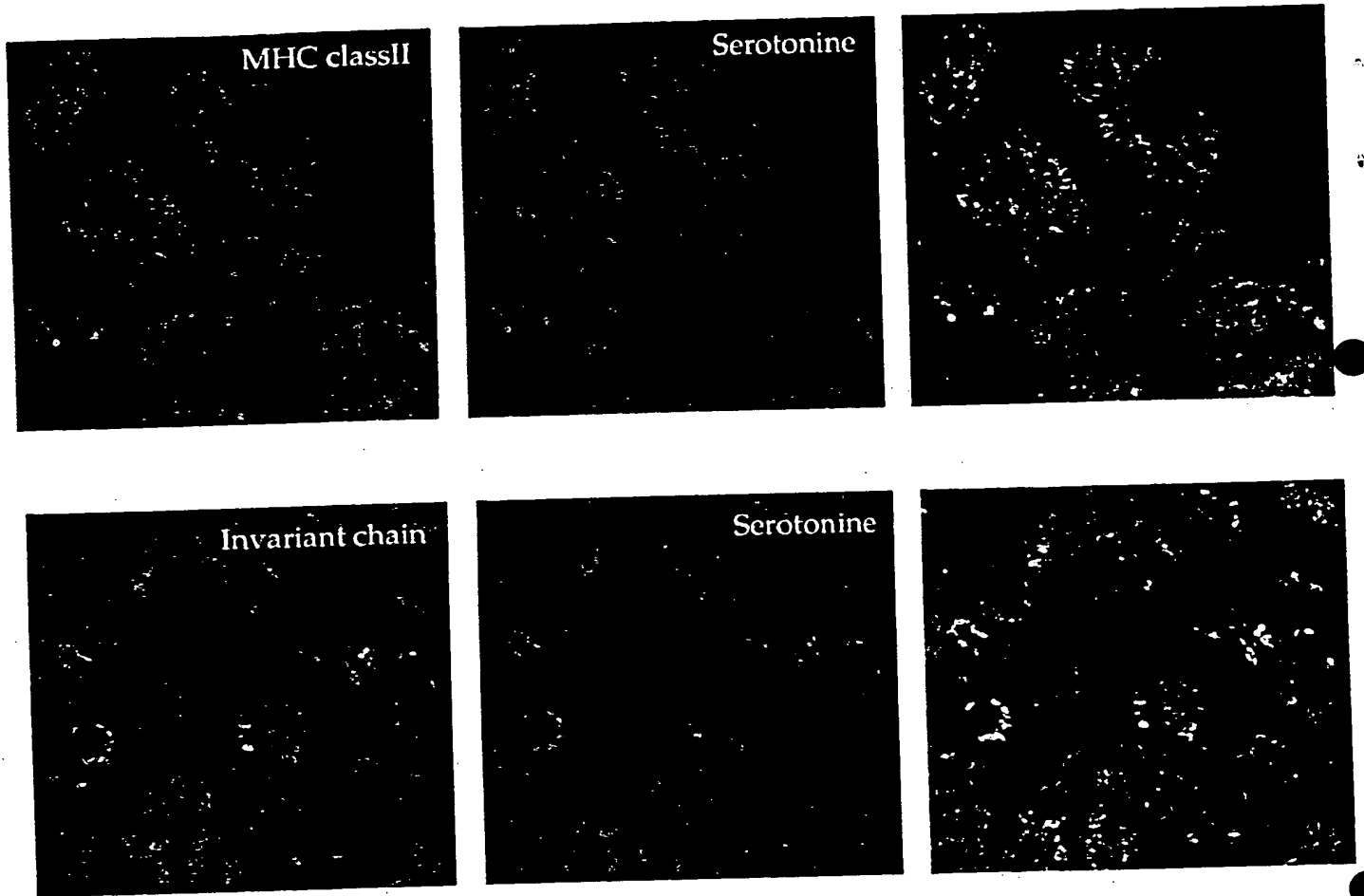


Figure 2

A



B

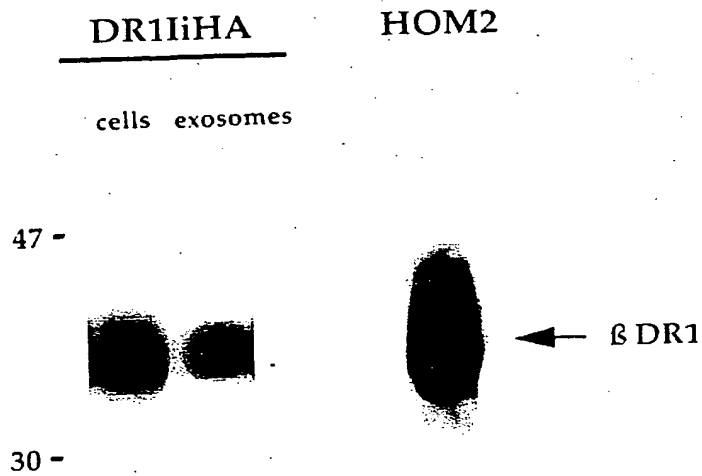


Figure 3

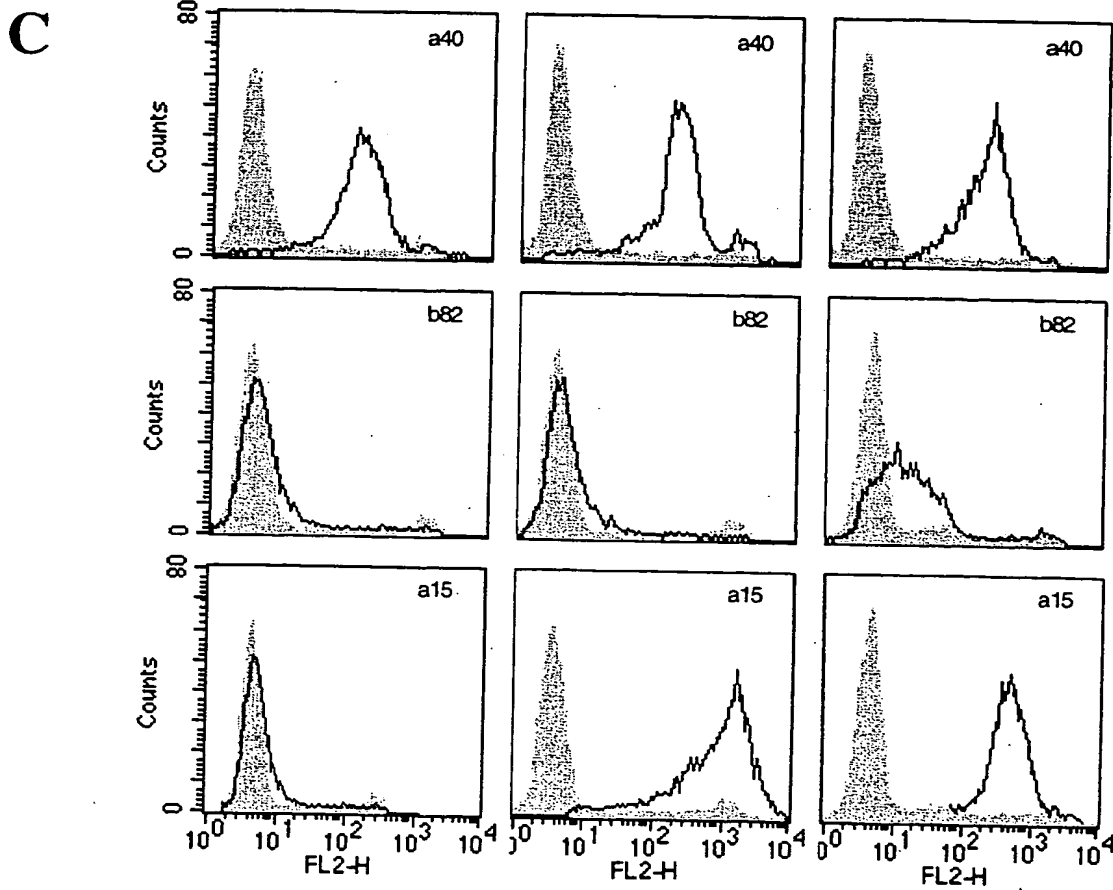
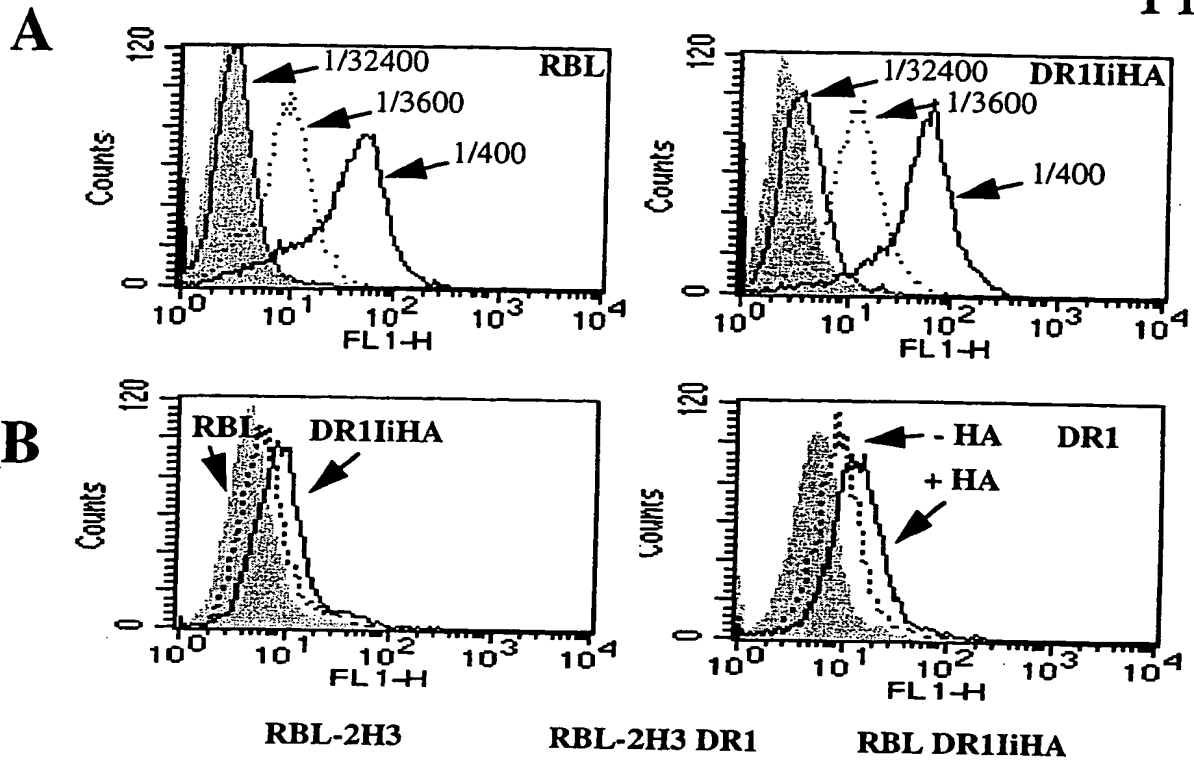
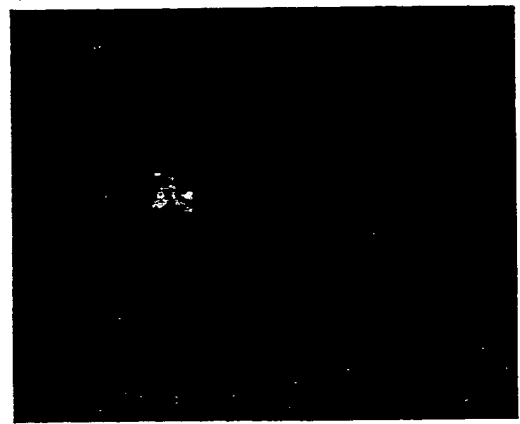
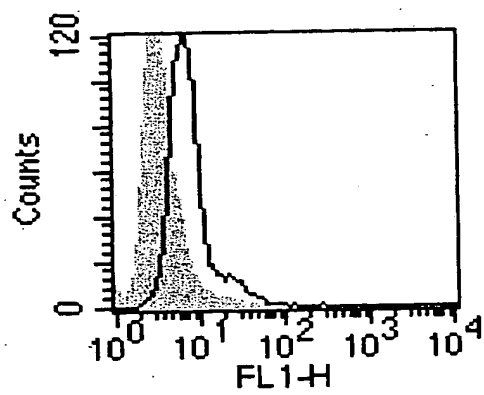


Figure 4

**A****B****C****THA****D****TH 30**